
BACHELORARBEIT

Frau
Maria Fankhänel

Charakterisierung der Interaktion von Tau und SUMO im Zellsystem

Mittweida, 2013

BACHELORARBEIT

Charakterisierung der Interaktion von Tau und SUMO im Zellsystem

Autor:

Frau

Maria Fankhänel

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI10w-2B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:

Dr. rer. nat. Katrin Eckermann

Einreichung:

Mittweida, 23.08.2013

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2013

Bibliographische Beschreibung:

Fankhänel, Maria: Charakterisierung der Interaktion von Tau und SUMO im Zellsystem. - 2013 – 7 Seiten Verzeichnisse, 63 Seiten Inhalt, 1 Seite Anhang, Mittweida, Hochschule Mittweida- University of Applied Sciences, Fakultät Mathematik/ Naturwissenschaften/ Informatik, Bachelorarbeit, 2013

Englischer Titel

Characterization of the Interaction between SUMO and Tau in a Cell Model

Kurzbeschreibung:

In dieser Arbeit wurde die Interaktion der Proteine Tau und SUMO untersucht. Für die Charakterisierung wurde zuerst die Methode der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation für das untersuchte System eingeführt, bei der ein geteiltes fluoreszierendes Protein durch eine Interaktion von Proteinen vervollständigt wird und ein Signal durch mikroskopische Auswertung detektiert werden kann. Nach verschiedenen Tests zur Funktionalität der Methode erfolgten Lokalisationsuntersuchungen der Proteine während einer Interaktion und bei alleiniger Expression in der Zelle.

Danksagung

Ich möchte Dr. Katrin Eckermann für die Möglichkeit danken, meine Bachelorarbeit in der Universitätsmedizin Göttingen durchführen zu können. Ich bedanke mich für die interessante Themenwahl und für ihre Anleitung. Es gilt mein Dank für die helfenden Gespräche und Ratschläge.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Röbbke Wünschiers für die Betreuung seitens der Hochschule Mittweida bedanken und für die Hilfe bei Fragestellungen.

Claudia Fokken danke ich für die Anleitung im Labor, für die Hilfe bei Problemen und für ihre Geduld.

Ich bedanke mich bei den restlichen Labormitgliedern Sabine Ceramella und Barbara Müller für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die Hilfestellungen.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets unterstützt und aufgemuntert haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Small Ubiquitin- Like Modifier (SUMO).....	2
1.1.1 Sumoylierungszyklus kovalent	4
1.1.2 Sumoylierungszyklus nicht- kovalent.....	5
1.2 Das Protein Tau als Zielprotein von SUMO.....	6
1.2.1 Eigenschaften und Struktur.....	6
1.2.2 Funktionen	7
1.3 Interaktion der Proteine Tau und SUMO.....	8
1.4 Das Gelb- Fluoreszierende Protein Venus als Biomarker	9
1.5.Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation als Nachweismethode der Interaktion von Tau und SUMO	10
2 Zielstellung	14
3 Material	15
3.1 Chemikalien und Zusammensetzungen	15
3.2 Medien	17
3.3 Molekularbiologische Reagenzien.....	17
3.4 Material.....	19
3.5 Geräte.....	19
4 Methoden	21
4.1 Klonierungstechniken	21
4.1.1 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)	21
4.1.2 Restriktion von Plasmid - DNA.....	22
4.1.3 Agarose - Gelelektrophorese	22
4.1.4 Gelextraktion von DNA - Fragmenten	22
4.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid - DNA.....	23
4.1.6 Ligation von DNA - Fragmenten.....	23
4.1.7 Transformation chemisch - kompetenter Zellen.....	23
4.1.8 Plasmidpräparation	24

4.1.9 DNA - Präzipitation mittels Ethanolfällung	24
4.2 Zellkultur eukaryotischer Zellen.....	25
4.3 Transfektion eukaryotischer Zellen	25
4.3.1 Calcium- Phosphat- Transfektionsverfahren	26
4.3.2 Lipofectamine 2000 TM Transfektionsverfahren	26
4.4 Nachweis sumoylierter Proteine mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	27
4.5 Proteinchemische Techniken	28
4.5.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen.....	28
4.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	28
4.5.3 SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (PAGE).....	29
4.5.4 Western Blot - Analysen auf Nitrocellulosemembranen	29
4.6 Immuncytochemische Färbung eukaryotischer Zellen	30
5 Ergebnisse	31
5.1 Test der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation als Nachweismethode der Interaktion von Tau und SUMO	31
5.1.1 Test der klonierten Konstrukte	31
5.1.2 Kontrollen	34
5.2 Untersuchung der Interaktion von Tau und SUMO in CSM14.1 – Zellen.....	35
5.2.1 Lokalisation von Tau in neuronalen Rattenzellen	36
5.2.2 Lokalisation von SUMO in neuronalen Rattenzellen	36
5.2.3 Lokalisation der Interaktionspartner SUMO und Tau in neuronalen Rattenzellen	38
5.3 Untersuchung der Interaktion von Tau und SUMO in HEK293 – Zellen.....	42
5.3.1 Lokalisation von Tau in humanen embryonalen Nierenzellen	42
5.3.2 Lokalisation von SUMO in humanen embryonalen Nierenzellen.....	43
5.3.3 Lokalisation der Interaktionspartner SUMO und Tau in humanen embryonalen Nierenzellen	44
6 Diskussion.....	46
6.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation als Nachweismethode der Interaktion von Tau und SUMO.....	46

6.2 Nachweis einer Interaktion von Tau und SUMO	49
6.2.1 Lokalisation der Proteine Tau und SUMO	49
6.2.2 Lokalisation der Proteine während einer Interaktion.....	51
7 Ausblick	55
8 Zusammenfassung	56
9 Summary	58
Anhang.....	59
Literaturverzeichnis	60
Selbstständigkeitserklärung	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vergleich der Struktur von SUMO und Ubiquitin	3
Abbildung 2 Kreislauf der SUMO- Konjugation	5
Abbildung 3 Modell der SIM- SUMO- Interaktion.....	6
Abbildung 4 Aminosäuresequenz der längsten Isoform (441 AS) im menschlichen Gehirn	7
Abbildung 5 SUMO- Bindungsstellen im Tau- Protein	9
Abbildung 6 Das Grün- Fluoreszierende Protein und zwei daoraus hervorgegangene Varianten.....	10
Abbildung 7 Prinzip der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation.....	12
Abbildung 8 Faltungsstruktur eines Fluoreszenzproteins und mögliche Spaltungsstellen	13
Abbildung 9 Klonierungsübersicht der Tau- / SUMO- BiFC- Konstrukte.....	32
Abbildung 10 Übersicht der möglichen Kombinationen zur Bildung eines BiFC- Komplexes	32
Abbildung 11 Vergleich der Expression der unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten der BiFC- Konstrukte.....	33
Abbildung 12 Test der klonierten Konstrukte auf eine alleinige Fluoreszenz.....	35
Abbildung 13 Lokalisation von Tau in CSM14.1 Zellen	36
Abbildung 14 Lokalisation von SUMO in CSM14.1 Zellen	37
Abbildung 15 Auffälligkeiten der SUMO- Färbung in CSM14.1 Zellen.....	38
Abbildung 16 Lokalisation von sumoyliertem Tau in der Kombination VN- Tau + VC- S2dGG.....	39
Abbildung 17 Lokalisation von sumoyliertem Tau in der Kombination VN- Tau + VC- S2	39
Abbildung 18 Lokalisation von SUMO in den BiFC- Komplexen VN- Tau + VC- S2dGG in neuronalen Zellen.....	40
Abbildung 19 Lokalisation von SUMO in den BiFC- Komplexen VN- Tau + VC- S2 in neuronalen Zellen.....	41
Abbildung 20 Besonderheiten der Lokalisation von sumoyliertem Tau in neuronalen Zellen	42

Abbildung 21 Lokalisation von Tau in HEK293 Zellen.....	43
Abbildung 22 Lokalisation von SUMO in HEK293 Zellen	43
Abbildung 23 Lokalisation von sumoyliertem Tau in HEK293 Zellen.....	44
Abbildung 24 Lokalisation von SUMO in den BiFC- Komplexen VN-Tau + VC- S2dGG und VN- Tau + VC- S2.....	45

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	engl.: Bicinchonic acid (Bicinchoninsäure)
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bp	Basenpaar
BSA	engl.: Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
bZIP	engl.: Basic Leucine Zipper Domain (Leucin- Zipper)
C- Terminal	Carboxyl- terminal
CSM	Immortalisierte nigrostriatale Rattenzellen
Cu	Kupfer
Cy3	Cyanin
Da	Dalton
DAPI	4', 6'- Diamidino-2-phenylindol
DMEM	engl.: Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4 Dithiothreitol
E	Enzym
ECL	engl.:Enhanced Chemiluminescence
EDTA	engl.:Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
FBS	engl.: Fetal Bovine Serum (Fetales Kälberserum)
GFP	Grün- Fluoreszierendes Protein
GMP	engl.: Gap Modifying Protein
HBS	engl.: HEPES Buffered Saline (HEPES gepufferte Kochsalzlösung)
HEK	Humane Embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	engl.: Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
k	Kilo
Kb	Kilobasenpaar
LB	engl.: Lysogeny Broth

M	Molar
MAPT	Mikrotubuli- Assoziiertes Protein Tau
MBD	engl.: Microtubule- Binding Domain (Mikrotubuli- Bindungsdomäne)
N- Terminal	Amino- terminal
NEM	N- Ethylmaleinimid
NGS	engl.: Normal Goat Serum (Gewöhnliches Ziegenserum)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	engl.: Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PPI	Protein- Protein- Interaktion
R	engl.: Repeat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per Minute (Umdrehungen pro Minute)
SAE	engl.: SUMO- Activating Enzyme Subunit
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SAS	engl.: SUMO attachment site
SBD	SUMO- Bindungsdomäne
SBM	SUMO- Bindungsmotiv
SENp	engl.: Sentrin- Specific Protease (Sentrin spezifische Protease)
SH2/3	engl.: Src- Homologue 2/3
SIM	engl.: SUMO- Interacting Motif (SUMO- Interaktionsmotiv)
Smt	engl.: Suppressor of mif two
SOC	engl.: Super Optimal broth with Catabolite repression
SUMO	engl.: Small ubiquitin-like modifier
TEMED	Tetramethylethyldiamin
UBL	engl.: Ubiquitin-like proteins
YFP	engl.: Yellow- Fluorescent Protein (Gelb- fluoreszierendes Protein)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Proteine bilden die Grundlage jeder lebenden Zelle, indem sie Struktur und Funktion bedingen. Biologische Aktivitäten werden durch einzelne Moleküle gesteuert, jedoch wird die Mehrzahl der Systeme durch die Interaktion verschiedener Proteine bestimmt. Dazu zählen u.a. die Prozesse der Genexpression, Proliferation und Apoptose. Weitere Mechanismen, die durch Protein- Protein- Interaktionen (PPI) reguliert werden, sind Signaltransduktion und die Wege des Metabolismus. PPI werden in stabile und transiente Bindungen unterschieden, wobei weiterhin eine Differenzierung in starke und schwache erfolgt. Stabile Interaktionen sind vor allem bei Proteinen zu finden, die einen Multi- Untereinheitenkomplex bilden. Dabei können diese Untereinheiten identisch oder aus verschiedenen Molekülen aufgebaut sein. Proteine mit mehreren Untereinheiten kommen in vielen Proteinklassen vor. Moleküle wie Hämoglobin, die RNA- Polymerase und die Tryptophan- Synthetase sind nur einige Beispiele. Andere gut bekannte Untereinheitenkomplexe sind die Pyruvat-Dehydrogenase, der DNA-Replikationskomplex von *Escherichia coli* und das Ribosom.

Die meisten Zellprozesse werden durch transiente Interaktionen gesteuert, da viele biologische Vorgänge nur kurzzeitig benötigt werden. Dazu zählt z.B. Proteintransport durch Membranen. Auch die Substratumsetzung mittels Enzymen erfolgt durch eine temporäre Bindung. Alle Proteinmodifikationen beinhalten transiente PPI. Interaktionen entstehen vorwiegend durch Wasserstoffbrückenbindungen, Van- der- Waals- Kräfte oder Ionenbindungen an bestimmten Bindungsdomänen. Diese Bindungsstellen können nur wenige Aminosäuren groß sein oder hunderte von Peptiden einschließen. Die Stärke der Bindung hängt von der Größe der Domäne ab. Eine häufige Oberflächendomäne, die stabile Interaktionen hervorruft, ist die bZIP- Domäne, auch Leucin- Zipper genannt. Sie besteht aus einer α - Helix mit wiederkehrenden Leucinen. Wenn zwei Proteine mit dieser Region aufeinandertreffen, verbinden sich die Helices und es entstehen Homo- und Heterodimere. Die zwei Src- Homologiedomänen SH2 und SH3 gehen transiente Interaktionen ein, um u.a. Signalproteine zu binden. SH2 erkennt Peptidsequenzen mit phosphorylierten Tyrosinen und SH3 identifiziert prolinreiche Regionen, wie sie z.B. im humanen Tau-Protein vorkommen.

Protein- Protein- Interaktionen haben biologische Effekte. So kann z.B. die Kinetik von Enzymen verändert werden, neue Bindungsstellen für weitere Interaktionen können erzeugt werden oder die Proteinspezifität wird verändert. Weiterhin können Zielproteine inaktiviert oder zerstört werden.

Mit dem heutigen Stand der Wissenschaft gibt es eine Vielzahl von Methoden, um PPI nachzuweisen. Dazu zählen Co- Immunpräzipitation, Yeast- Two- Hybrid- Systeme, Pulldown- Versuche oder Proteinvernetzung. Stabile Interaktionen sind leichter nachzuweisen als transiente, da der Proteinkomplex bei der Isolierung und Aufbereitung erhalten bleibt. Transiente PPI dagegen müssen zuerst kovalent fixiert werden, damit die Proteine in ihrer Form bleiben [URL1; Phizicky & Stanley, 1995]. Es ist bekannt, dass das Protein SUMO Interaktionen mit anderen Proteinen eingeht. Dazu zählt u.a. das Mikrotubuli- Assoziierte Protein Tau, das in vielen neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. Alzheimer, eine Rolle spielt.

1.1 Small Ubiquitin- Like Modifier (SUMO)

Der Small Ubiquitin- Like Modifier (SUMO) wurde 1996 entdeckt und hat seitdem eine enorme Bedeutung für die Wissenschaft erhalten, da er essentielle Funktionen für eukaryotische Zellen übernimmt. Weiterhin sind seine Substrate wichtige biomedizinische Proteine, wie z.B. der Tumorsuppressor p53, Huntingtin und Tau [Dohmen, 2004]. Das 12 kDa schwere Protein weist nur 18 % Sequenzhomologie zu Ubiquitin auf, besitzt aber das charakteristische Faltungsmuster der Tertiärstruktur (siehe Abbildung 1). Die Verteilung geladener Aminosäuren (AS) auf der Oberfläche von SUMO differenziert stark zu Ubiquitin und anderen Ubiquitin- ähnlichen Proteinen, da es vorwiegend negative Ladungen besitzt, wohingegen Ubiquitin mit positiven Ladungen versehen ist. SUMO- Familien besitzen eine unstrukturierte N- terminale Erweiterung, die für weitere Protein- Protein- Interaktionen zur Verfügung stehen [Wilson, 2009; Gill, 2004].

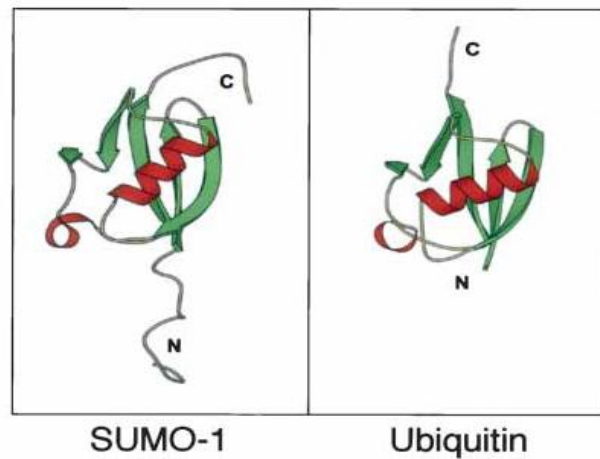


Abbildung 1 Vergleich der Strukturen von SUMO und Ubiquitin

SUMO besitzt das gleiche Faltungsmuster wie Ubiquitin bestehend aus vier Beta- Faltblättern und einer Alpha- Helix. Die roten Markierungen stellen besondere Bereiche der Sequenz dar, die eine Rolle bei Proteinmodifikationen spielen [modifiziert nach Gill, 2004].

Die Anzahl an SUMO- Isoformen in Organismen ist spezifisch. So besitzt *Saccharomyces cerevisiae* ein SUMO, welches auch als Smt3 bezeichnet wird. Kommt es zur Deletion des Proteins, führt dies zum Verlust der Lebensfähigkeit. Bei Säugetieren sind vier SUMO- Gene bekannt, die als SUMO-1 bis -4 gekennzeichnet sind. SUMO-1 (andere Namen UBL1, Sentrin, GMP1, Smt3c) ist aus 101 Aminosäuren aufgebaut und kommt im Nukleolus und in der Kernmembran vor [URL2]. SUMO-2 (andere Namen Sentrin2, Smt3b, GMP-related protein) und SUMO-3 (andere Namen Sentrin3, Smt3a) unterscheiden sich nur durch drei N-terminale Aminosäuren, d.h. sie weisen eine Sequenzidentität von 92 % auf. Aus diesem Grund werden sie oft zusammengefasst als SUMO2/3 dargestellt. Sie besitzen nur eine Sequenzähnlichkeit von 50 % zu SUMO-1. SUMO2/3 sind an Chromosomen zu finden. SUMO-1 bindet als Monomer an Substrate und könnte als Kettenterminator an SUMO2/3- Polymeren dienen. SUMO-4 zeigt eine 97 %- ge Sequenzähnlichkeit zu SUMO-2 [Wilkinson & Henley, 2010; Wilson, 2009].

1.1.1 Sumoylierungszyklus kovalent

Die Konjugation von SUMO, auch Sumoylierung genannt, ähnelt stark der Ubiquitinierung, bei der durch kovalente Bindung ein Modifizierer an einen Lysinrest spezifischer Zielproteine gehangen wird. Dafür ist eine Reihe von Enzymen notwendig, die mittels Enzymkaskade den Prozess steuern. Der Vorgang ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Zielproteine sind meist nuklear, wie Transkriptionsfaktoren oder DNA-Regulationsproteine, sie kommen aber auch cytoplasmatisch als Transportproteine vor [Wilkinson & Henley, 2010; Karlson, 2005].

SUMO wird zuerst als inaktives Vorläuferprotein hergestellt und durch C-terminale Spaltung mittels SENP Enzymen (Sentrin-Specific Protease) funktionsfähig. Die Spaltung legt ein Glycin-Glycin-Motiv frei, das die spätere Konjugation erlaubt. Während jedes Zyklus sind drei SUMO-Enzyme beteiligt. Das E1, „aktivierendes Enzym“, aktiviert die SUMOs in einem ATP-abhängigen Schritt. E1 ist ein Heterodimer aus den Proteinen SAE1 und SAE2, welche die SUMO-activating enzyme subunits 1 und 2 darstellen. Dabei wird eine Thioesterbindung zwischen einem Cystein von E1 mit einem C-terminalen Glycin des reifen SUMOs gebildet. Im nächsten Schritt wird das SUMO von E1 zur Bindungsstelle des E2, „konjugierendes Enzym“, transferiert und ebenfalls durch eine Thioesterbindung verknüpft. Das E2 wird auch als Ubc9 (ubiquitin-conjugation 9) bezeichnet. Nun erfolgt die Konjugation des SUMOs an das Zielprotein. E2 bindet mittels Isopeptidbindung das C-terminale Glycin des Modifizierers an eine ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Zielprotein [Sarge & Sarge, 2009; Wilkinson & Henley, 2010]. In mehreren Studien zeigte sich, dass bei der SUMO-1 Konjugation das gebundene Lysin in dem Konsensusmotiv Ψ KxD/E liegt. Ψ steht dabei für eine hydrophobe Aminosäure, meist Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin oder Phenylalanin. K stellt das Ziellysin dar, x eine beliebige Aminosäure und an vierter Stelle befindet sich Asparagin- oder Glutaminsäure. Manchmal ist die letzte Position nicht im Motiv zu finden. Das Muster wird auch als SAS, „SUMO attachment site“, bezeichnet [Karlson, 2005]. Das dritte beteiligte Enzym, die E3 Ligase, kann die Sumoylierung durch Verbindung von E2 und Substrat stimulieren. Dabei wird die Effizienz der Reaktion erhöht [Sarge & Sarge, 2009].

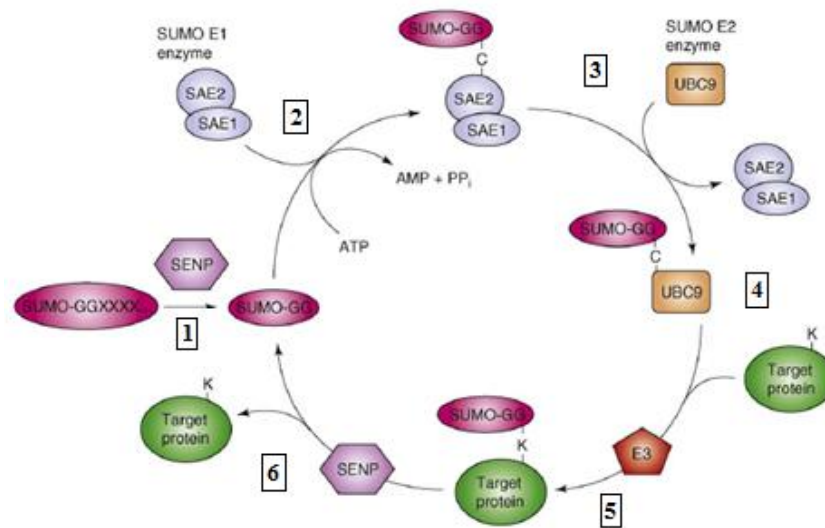


Abbildung 2 Kreislauf der SUMO- Konjugation

SUMO wird durch C- terminale Spaltung mittels SENP Enzymen aufgebaut und ein Doppel- Glycin-Motiv wird eröffnet (1). Das reife SUMO wird in einem ATP- abhängigen Prozess mittels Thioesterbindung an das E1 gehängt und aktiviert (2). Danach wird das SUMO an die Bindungsstelle des E2 (Ubc9) transferiert (3), welches die Konjugation von SUMO und Zielprotein katalysiert (4+5). Eine E3 Ligase unterstützt meist diesen Schritt. Der SUMO- Substrat- Komplex kann durch die SENP wieder aufgelöst werden und in seine unkongjugierte Form zerfallen (6) [modifiziert nach Sarge & Sarge, 2009].

1.1.2 Sumoylierungszyklus nicht- kovalent

Es zeigte sich, dass die Interaktion von SUMO und Substrat nicht nur kovalent, sondern auch nicht- kovalent möglich ist [Minty et al., 2000]. Zielproteine, die nicht durch die Bindung über das Doppel- Glycinmotiv sumoyliert werden, können über ein SUMO- Interaktionsmotiv (SIM) gebunden werden. Dieses wird auch SUMO- Bindungsdomäne (SBD) oder –motiv (SBM) genannt. SIMs besitzen einen hydrophoben Kern und sind von sauren Aminosäuren oder phosphorylierten Serinen umrahmt. Daraus ergibt sich folgendes Motiv: Ser-Xaa-Ser, kurz SXS (Ser/S = Serin, Xaa/X = jede Aminosäure). In anderen Studien wurden weitere Muster vorgeschlagen: V/I-x-V/I-V/I oder V/I-V/I-x-V/I/L, wobei Position zwei und drei eine beliebige Aminosäure ist [Wilkinson & Henley, 2010; Kerscher, 2007]. Das Modell schlägt vor, dass bei der Interaktion die hydrophoben Aminosäuren der SIMs mit aromatischen Aminosäuren von SUMO binden. Dabei werden diese in eine SIM- Bindungsfurche am SUMO zwischen dem Beta2- Faltblatt und der Alpha- Helix eingelagert, wodurch sich ein intramolekulares Faltblatt ausbildet. Die flankierenden Serine, manchmal Threonine, werden phosphoryliert und erzeugen eine negative Ladung der SIMs.

Somit sind sie in der Lage an Lysinreste zu binden, die sich in der Furche im SUMO befinden (Abbildung 3). Diese Bindung kann in zwei gegenständigen Orientierungen (parallel oder antiparallel) ablaufen. Dies hängt von der Lage der hydrophoben und negativ geladenen AS ab [Merrill et al., 2010; Kerscher, 2007]. Die nicht- kovalente Sumoylierung spielt eine große Rolle bei Zellkernmechanismen, wie DNA- Reparatur und Kernkörperchenformation [Martin et al, 2007].

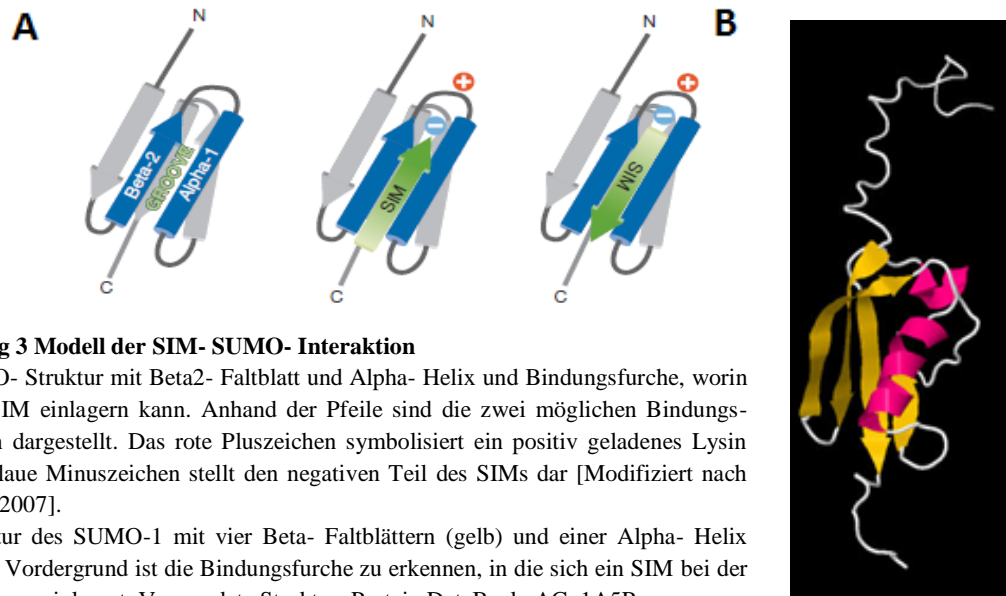


Abbildung 3 Modell der SIM- SUMO- Interaktion

(A) SUMO- Struktur mit Beta2- Faltblatt und Alpha- Helix und Bindungsfurche, worin sich ein SIM einlagern kann. Anhand der Pfeile sind die zwei möglichen Bindungsrichtungen dargestellt. Das rote Pluszeichen symbolisiert ein positiv geladenes Lysin und das blaue Minuszeichen stellt den negativen Teil des SIMs dar [Modifiziert nach Kerscher, 2007].

(B) Struktur des SUMO-1 mit vier Beta- Faltblättern (gelb) und einer Alpha- Helix (pink). Im Vordergrund ist die Bindungsfurche zu erkennen, in die sich ein SIM bei der Sumoylierung einlagert. Verwendete Struktur: Protein DataBank, AC: 1A5R.

1.2 Das Protein Tau als Zielprotein von SUMO

1.2.1 Eigenschaften und Struktur

Tau wurde in den 1970er Jahren entdeckt und stellt ein natürlich- ungefaltetes Protein dar, welches ohne Bindungspartner keine Sekundärstruktur aufweist. Im zentralen und peripheren Nervensystem ist es hoch exprimiert und spielt eine große Rolle in verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten, wie Parkinson und Alzheimer. Daher werden diese Störungen auch als Tauopathien bezeichnet [Dorval & Fraser, 2006; Sarge & Sarge, 2009]. Das lösliche und hitzestabile Protein kommt meist in Axonen vor, aber es konnte ebenfalls in dephosphorylierter Form in somatodendritischen Bereichen nachgewiesen werden. Strukturell kann Tau in vier Regionen unterteilt werden (Abbildung 4) – N-terminale Projektionsregion, Prolinreiche Domäne, Mikrotubuli- Bindungsdomäne (MBD) und C- terminale Region [Morris et al., 2011].

Beim Menschen werden im ZNS sechs Isoformen exprimiert. Dafür wird das dazugehörige MAPT Gen auf dem Chromosom 17 (Locus: 17q21.1) verwirklicht und gespleißt. Das Gen besitzt insgesamt 16 codierende Bereiche, wobei das Spleißen der Exons 2,3 und 10 die sechs Isoformen bedingen. Diese unterschiedlichen Ausprägungen unterscheiden sich durch An- oder Abwesenheit von ein oder zwei N- terminalen Insertionen und durch Einlagerung oder Ausschluss des zweiten von vier Pseudorepeats in der MBD [Morris et al., 2011; Schneider & Mandelkow, 2008].

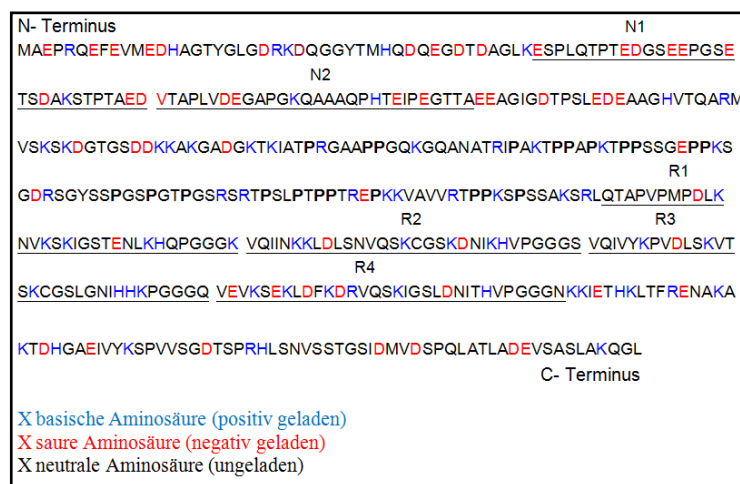


Abbildung 4 Aminosäuresequenz der längsten Isoform (441 AS) im menschlichen Gehirn

N1 und N2: 29 As lange Regionen im N- terminalen Bereich. P: Prolinreiche Region.

R1-R4: Mikrotubuli- Bindungsdomäne, 31 oder 32 AS lang [Erstellt und modifiziert mit Protein Colourer, EBI].

1.2.2 Funktionen

Tau ist ein Mikrotubuli- Assoziiertes Protein (MAP), das die Fähigkeit besitzt an Mikrotubuli zu binden und diese zu stabilisieren. Dies könnte durch Phosphorylierung negativ reguliert werden. Mikrotubuli müssen als Teil des Cytoskeletts in der Lage sein, zu wachsen und zu schrumpfen, je nachdem wie die Zelle ihre Form ändert. Dies ist die Voraussetzung für neuronale Polarität und Axonüberspannung [Dorval & Fraser, 2006; Schneider & Mandelkow, 2008].

Tau bindet an die Außenseite und möglicherweise an die Innenseite der Mikrotubuli, wobei der N- und C- Terminus nach außen gerichtet ist. Die Fähigkeit an das Cytoskelett zu binden, hängt von der Mikrotubuli- Bindungsdomäne ab [Morris et al., 2011; Kolarova, 2012].

Die MBD besteht aus vier konservierten Wiederholungen (R1- R4), die 31 oder 32 AS lang sind. Im fetalen Tau sind drei und in adulter Form vier Regionen exprimiert [Kar, 2002].

Das Molekül bildet einen Dipol mit zwei Regionen entgegengesetzter Ladung, da der N- terminale Bereich negativ und der C- terminale positiv geladen ist. Diese Eigenschaft wird beim axonalen Transport genutzt und könnte für Posttranslationale Modifikationen eine Rolle spielen. Weiterhin kann der N- Terminus mit der Zellmembran assoziieren. Die prolinreiche Domäne des Proteins besitzt viele Phosphorylierungsstellen und kann an die SH3 Domäne anderer Proteine binden [Morris et al., 2011; Kolarova, 2012].

Bei einer pathologischen Ausprägung vollziehen Proteinteile eine Strukturveränderung von Random Coil zu Beta- Faltblatt. Dies wird von einer Verdichtung und Fibrillenformation begleitet, was zu intrazellulären Einlagerungen und Neurodegeneration führt [Dorval & Fraser, 2006].

1.3 Interaktion der Proteine Tau und SUMO

Tau wird vielen Posttranslationalen Modifikationen, wie Acetylierung, Proteinvernetzung, Phosphorylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung unterzogen. Die Tau- Sumoylierung könnte durch Phosphorylierung reguliert sein, indem durch den Prozess Tau von den Mikrotubuli abgelöst wird und frei vorliegt.

Es wird vermutet, dass SUMO bevorzugt an ungebundenes Tau konjugiert [Sarge & Sarge, 2009; Morris et al. 2011]. Das Protein besitzt zwei nachgewiesene SUMO- Konsensussequenzen, wobei das Lysin an der Stelle 340 bevorzugt ist (Abbildung 5). Dieses ist im vierten Mikrotubuli- Bindungsrepeat lokalisiert. Die Motive sind VK340SE und AK385TD [Dorval & Fraser, 2006]. Bisher ist keine nicht-kovalente Sumoylierung von Tau bekannt. Mit dem Programm 3of5 können Motive in Sequenzen ermittelt werden. Dies wurde für die Tausequenz angewendet, um mögliche SUMO- Interaktionsmotive zu finden. Dabei wurden die vorgeschlagenen Motive SXS, V/I-x-V/I-V/I oder V/I-V/I-x-V/I/L verwendet. Es zeigte sich, dass Tau mehrere mögliche Bindungsmotive besitzt (Abbildung 5). Die möglichen SIMs VAVV und SPS befinden sich in der prolinreichen Domäne.

Die Motive VQII und VQIV dagegen liegen in den Bindungsrepeats R2 und R3. Eine weitere mögliche Bindungsstelle für SUMO befindet sich im C- Terminalen Bereich.

1	MAEPRQEF	EV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT
51	PTEDGSEEPG	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTETIEG	
101	TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	
151	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK	TPPSSGEPPK	SGDRSGYSSP	
201	GSPGTPGSRS	RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK	SRLQTAPVPM	
251	PDLKNVSKSI	GSTENLKHQP	GGGKVQIINK	KLDLSNVQSK	CGSKDNIKHV	
301	PGGGSVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDKDFKDRV	
351	QSKIGSLDNI	THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	
401	GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV	DSPQLATLAD	EVSAASLAKQG	L	

Abbildung 5 SUMO- Bindungsstellen im Tau- Protein

Sequenz des Tau-Proteins (Isoform 2) mit hervorgehobenen SUMO- Konsensusmotiven. Die rot unterstrichenen Bereiche zeigen bereits nachgewiesene Konjugationsstellen von SUMO. Die blau unterlegten Aminosäuren weisen mögliche SUMO- Interaktionsmotive auf, die mit dem Programm 3of5 ermittelt worden [Zugriff Server 01.05.2013, Sequenz: NCBI, AC:NP_005901].

1.4 Das Gelb- Fluoreszierende Protein Venus als Biomarker

Fluoreszenzproteine gehören einer strukturell homologen Proteinklasse an, die alle die einzigartige Eigenschaft besitzen, selbständig ein sichtbares Chromophor zu bilden. Diese Fähigkeit kann in der Forschung genutzt werden, indem die Proteine als Biomarker eingesetzt werden. Dadurch können z.B. Prozesse der Posttranslationalen Modifikation, Proteinfaltung, -aggregation oder Genexpression untersucht werden. Das bekannteste und meist untersuchte Protein dieser Klasse ist das Grün-Fluoreszierende Protein, kurz GFP [Tsien, 1998]. Dieses wurde aus dem Organismus *Aequorea victoria* isoliert und stellt heute den meist genutzten Biomarker in der Wissenschaft dar [Hsu et al. 2009; Isogai et al., 2011]. Das aus 238 Aminosäuren bestehende GFP wird als Tag C- oder N- Terminal an andere Proteine fusioniert und exprimiert. Dies konnte für verschiedene Organismen wie Bakterien, Hefen, Pflanzen und Säugetiere durchgeführt werden [URL2].

Um eine Fluoreszenz zu erzeugen, muss das Protein eine Reifung durchlaufen, welche in drei Schritten abläuft. Zuerst faltet sich die Polypeptidkette in ihre natürliche Form. Anschließend erfolgt ein Ringschluss an den Aminosäuren 65 bis 67 und im letzten Schritt findet eine Oxidation statt, bei der das Chromophor gebildet wird. Dieser Prozess nimmt eine gewisse Zeit in Anspruch, wenn er bei Raumtemperatur abläuft.

Findet diese Reaktion bei 37 °C statt, verschlechtert sich die Ausbildung, was die Benutzung von GFP einschränkt [Rekas et al., 2002]. In den letzten Jahren wurde daher eine Vielzahl von GFP- Varianten eingeführt, die eine verbesserte Chromophorbildung aufweisen. Diese Proteine stammen aus natürlichen Quellen oder wurden durch Mutagenese hergestellt. Dazu zählt das Gelb- Fluoreszierende Protein (YFP) Venus, das von Nagai et al. vorgestellt wurde. Diese Variante enthält Mutationen, die die Effizienz des Proteins als Biomarker erhöhen [Nagai et al., 2002]. Durch die Änderungen der 238 AS- langen Sequenz ist eine schnellere Chromophorbildung möglich und die Helligkeit der Fluoreszenz steigt. Weiterhin ist Venus relativ unsensitiv gegenüber pH- Wertänderungen, Ionenkonzentrationen und Umwelteinflüssen [Hsu et al. 2009; Isogai et al., 2011]. Die Mutationen im Vergleich zu GFP sind folgende: F46L, F64L, M153T, V163A, S175G. Zusätzlich enthält Venus vier weitere Änderungen, die bereits in der aus GFP hervorgegangen Variante EYFP zu finden sind (Abbildung 6). Die Mutationen beschleunigen die Reifung bei 37 °C, indem Regionen größerer Flexibilität entstehen. Die neue Mutation an der Stelle 46 führt zu weiteren Konformationsänderungen im Molekül, was eine Beschleunigung der Oxidation während der Reifung ermöglicht. Dadurch erfolgt diese noch schneller und das Chromophor kann in kürzester Zeit gebildet werden [Rekas et al., 2002].

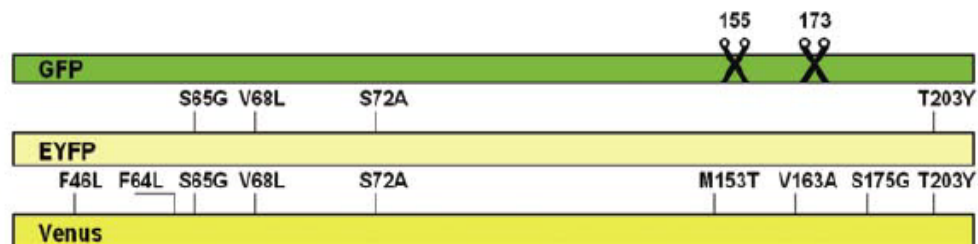


Abbildung 6 Das Grün- Fluoreszierende Protein und zwei daraus hervorgegangene Varianten

Übersicht über die Substitutionen des GFP, bei der neue Varianten von fluoreszierenden Proteinen entstanden. Das Enhanced YFP enthält vier Mutationen, die eine schnellere Chromophorbildung erlauben. Venus besitzt vier zusätzliche Änderungen, die die Helligkeit erhöhen und die Reifung noch weiter beschleunigen. Die Scherensymbole zeigen die Schnittstellen, an denen die Proteine meist geteilt werden [modifiziert nach Shyu et al., 2006].

Im Vergleich zum Wildtyp des GFP besitzt Venus ein Anregungsmaximum von 515 nm (GFP 395 nm). Das Emissionsmaximum liegt bei 530 nm, wohingegen es 508 nm bei GFP beträgt. Die gelb- fluoreszierenden Varianten von GFP zeigten anfangs eine größere Sensitivität gegenüber äußeren Einflüssen, die die Emission beeinflussten.

Erst durch die Einführung weiterer Mutationen, wie bei Venus, konnte diese Anfälligkeit verringert werden und eine bessere Fluoreszenz erzeugt werden [Tsien, 1998; Rekas et al., 2002].

Strukturell weist Venus die typische Form des Grün- Fluoreszierenden Proteins auf. Die Struktur besteht aus elf antiparallelen Beta- Faltblättern, die in einem β - Fass angeordnet sind. Diese umrahmen eine zentrale Alpha- Helix, die das Chromophor enthält. Die verbesserten Eigenschaften des Proteins Venus ermöglichen einen vielfältigen Einsatz in der Wissenschaft. Weit verbreitet ist der Einsatz bei Untersuchungen von Protein- Protein- Interaktionen.

1.5. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation als Nachweismethode der Interaktion von Tau und SUMO

Protein- Protein- Interaktionen haben eine enorme Bedeutung im Zellzyklus, da sie in essentielle Prozesse involviert sind. Das Ziel der Wissenschaft ist es mit geeigneten Methoden diese Mechanismen in lebenden Zellen zu zeigen. In den letzten Jahren entwickelte sich die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) als vielseitig einsetzbare Methode, um Interaktionen von Proteinen nachzuweisen. Das Prinzip beruht auf der Vervollständigung zweier nicht- fluoreszierender Fragmente eines Fluoreszenzproteins, die an zwei zu untersuchende Moleküle gebunden sind. Der Mechanismus ist in Abbildung 7 dargestellt. Findet eine Interaktion der Proteine statt, kann ein Fluoreszenzsignal durch Mikroskopie in lebenden Zellen detektiert werden. Ein Vorteil dieser Methode ist die hohe intrinsische Fluoreszenz der Proteine, was ein Färben mit exogenen Fluorophoren verhindert und die zu untersuchenden Zellen werden nicht gestört. Weiterhin können multiple Proteininteraktionen parallel gezeigt werden [Kerppola, 2008].

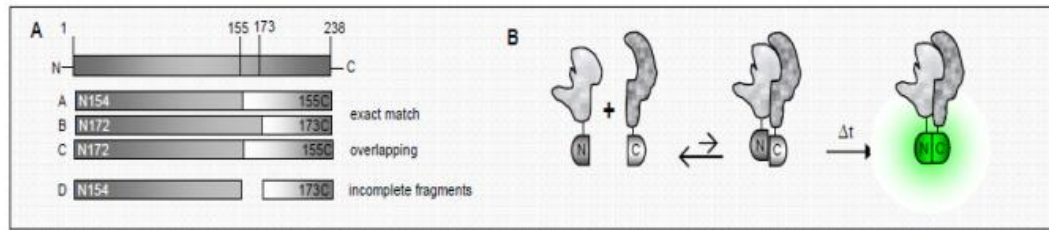


Abbildung 7 Prinzip der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation

A: Fluoreszierende Proteine können an verschiedenen Stellen der Sequenz gespalten werden. Eine Vervollständigung kann in unterschiedlichen Kombinationen erfolgen (A-C). Dabei ist eine Proteinüberlappung möglich, was nicht zum Funktionsverlust führt. Eine Kombination (D) führt zum Verlust der fluoreszierenden Eigenschaft, da Teile der Sequenz fehlen.

B: Prinzip der BiFC, bei der durch Interaktion zweier Proteine ein Fluoreszenzprotein zusammengesetzt wird und ein Fluoreszenzsignal detektierbar ist. Der gebildete Komplex ist thermodynamisch stabil und kann schwache Interaktionen stabilisieren [modifiziert nach Förg].

Findet eine Interaktion statt, wird ein BiFC- Komplex gebildet, der meist irreversibel und thermodynamisch stabil ist. Dadurch ist es möglich, instabile Interaktionen zu zeigen. Die Methode weist einige Nachteile auf. Es gibt eine zeitliche Verzögerung zwischen der Interaktion der Proteine und einer sichtbaren Fluoreszenz. Der Grund dafür ist die große Anzahl an chemischen Reaktionen, die notwendig sind, um das Fluorophor herzustellen. Somit ist keine Echtzeit- Detektion möglich. Weiterhin beträgt die Fluoreszenzintensität, die durch Komplementationen entsteht, nur etwa 10 % der intakten Fluoreszenzproteine. Dies ist nicht auf eine geringere intrinsische Fluoreszenz der BiFC- Komplexe zurückzuführen, sondern auf den prozentualen Anteil der interagierenden Proteine. Nur ein kleiner Teil der Moleküle geht eine Bindung ein, da eine räumliche Trennung der Interaktionspartner vorliegen kann oder die Proteine in andere Interaktionen involviert sind [Kerppola, 2008 und Förg, 2010]. Bisher sind 15 Fluoreszenzproteine bekannt, die im BiFC eingesetzt werden können. Diese Proteine können in einem Loop oder innerhalb eines Beta- Faltblattes gespalten werden. Bei GFP und dessen Varianten kann die Teilung zwischen den Faltblättern 6 und 7, im 7. Beta-Strand, im Loop zwischen den Faltblättern 7 und 8, im 8. Strand oder im Loop zwischen den 7. und 8. Faltblättern erfolgen [Kodama und Hu, 2010].

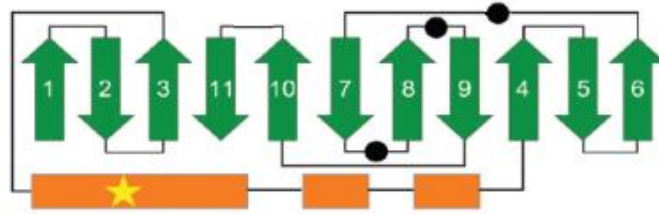


Abbildung 8 Faltungsstruktur eines Fluoreszenzproteins und mögliche Spaltungsstellen

Die grünen Pfeile zeigen die elf Beta- Faltblätter eines Fluoreszenzproteins. Die orangen Balken symbolisieren Alpha- Helices, wobei im größten Balken das Fluorophor als Stern dargestellt ist. Die schwarzen Punkte zeigen die möglichen Spaltpositionen in den Loopregionen [modifiziert nach Kodama und Hu, 2010].

In Abbildung 7 ist eine Übersicht der Schnittstellen in den Sequenzen und dessen Komplementationsmöglichkeiten dargestellt. Es können nicht nur die geteilten Fragmente zusammengesetzt werden, sondern auch Teile unterschiedlicher Schnittstellen. In der Studie von Förg zeigte sich die Kombination aus N173 + 155C als effizienter als die Vervollständigung der ursprünglich geteilten Proteine. Dies ist auf die Konformation der Proteine zurückzuführen [Förg, 2010].

Ein Problem der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation ist die Selbstassemblierung der fluoreszierenden Proteine, was zu falsch- positiven Ergebnissen führt. Daher müssen Kontrollen eingesetzt werden, die dies ausschließen. Am geeignetsten sind Kontrollen, bei denen die Interaktionsfläche der zu untersuchenden Moleküle mutiert wurde, damit eine Interaktion generell ausgeschlossen werden kann und keine Fluoreszenz zu detektieren sein müsste [Shyu, 2008]. Das Fluoreszenzprotein Venus wird meist an der Stelle 155 oder 173 gespalten. Diese Regionen sind Loop- Bereiche zwischen dem 7. und 8. Beta- Faltblatt und dem 8. und 9. Faltblatt. Das N- terminale Fragment, das den vorderen Teil des Proteins beinhaltet, wird als VN bezeichnet und das andere Teilstück als VC.

2 Zielstellung

Die Sumoylierung erlangte in den letzten Jahren eine enorme Bedeutung für die Wissenschaft, da es ein wichtiger Regulator von zellulären Prozessen ist. Dazu zählen z.B. Zelldifferenzierung, Zellwachstum, Transkriptionsfaktoraktivität, subzelluläre Lokalisation und Protein- Protein- Interaktion. Als Substrat wird eine Vielzahl von Proteinen sumoyliert. Darunter befinden sich einige, die Krankheiten wie Krebs, Huntington Syndrom und Demenz verursachen. Dazu zählt auch Tau, welches u.a. in Alzheimer involviert ist. Daher ist es wichtig die Mechanismen und Modifikationen des Proteins zu kennen, um dessen Rolle im Krankheitsverlauf zu untersuchen. Dorval und Fraser konnten 2005 das erste Mal nachweisen, dass Tau sumoyliert wird. In ihren Funktionsstudien schlugen sie vor, dass es ein dynamisches Zusammenspiel zwischen Tausumoylierung und Proteasominhibierung gibt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass freies Tau, d.h. nicht an Mikrotubuli gebunden, mehr sumoyliert wird als gebundenes [Dorval & Fraser, 2005]. Diese Erkenntnisse könnten bei der Erforschung neurodegenerativer Krankheiten von Bedeutung sein.

Wie in einigen Studien beschrieben, kann die Bindung von SUMO an seine Zielproteine nicht- kovalent über SUMO- Interaktionsmotive (SIM) erfolgen. Dies konnte 2000 das erste Mal von Minty und Co. an dem Protein p73 gezeigt werden. Seitdem sind weitere Proteine identifiziert worden, die über SIMs an SUMO gebunden werden. Dazu zählen z.B. Proteine, wie die Thymin- DNA- Glycosylase, die falschgesetzte Thymine in der DNA ersetzt und SUMO- Proteasen selbst [Kerscher, 2007].

Der Nachweis von Protein- Protein- Interaktionen stellt die Grundlage zum Verständnis vieler Mechanismen dar. Um diese Wechselwirkungen zu untersuchen, sind einige Methoden bekannt. Dazu zählt z.B. das Yeast- Two- Hybrid- Verfahren, Affinitäts- chromatographie oder Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation. Letztere sollte in dieser Arbeit für die Proteine Tau und SUMO angewendet werden, um die Interaktion der Moleküle zu charakterisieren. Dafür sollte die Methode in verschiedenen Bedingungen getestet werden, um ein funktionierendes System zu entwickeln, welches den Nachweis von Wechselwirkungen erlaubt. Weiterhin sollten Lokalisations- untersuchungen für die Proteine durchgeführt werden.

3 Material

3.1 Chemikalien und Zusammensetzungen

Chemikalie	Hersteller
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Bromphenolblausalzlösung	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg/Deutschland
Calciumchlorid- Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
D- Glucose, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
DAPI	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
FBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe/Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen Life Technologies Corporation, Karlsruhe/Deutschland
Milchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
N- Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Natrium- Dihydrogenphosphat Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
NGS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe/Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe/Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
LB- Agar	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
LB Medium	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Natriumacetat (CH_3COONa)	Fluka/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland

Ethanol 100 %	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
Complete Proteaseinhibitor (25x)	F. Hoffmann-La Roche Ltd, Mannheim/Deutschland
BSA	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
Fluoromount	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Protein G- Sepharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Pepstatin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
Triton X- 100	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe/Deutschland
Tween- 20	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland

Zusammensetzungen Puffer	Konzentrationen
Calcium- Phosphat-Transfektion: HBS	280 mM NaCl, 10 mM KCl, Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O, 12 mM D-Glucose, 50 mM HEPES, pH 7,05
Agarose- Gelelektrophorese: TBE- Puffer	42 mM Borsäure, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
SDS- PAGE: Elektrophoresepuffer	192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 25 mM Tris- HCl, pH 8,3
Puffer für die Western Blot- Analyse:	
Transferpuffer	192 mM Glycin, 20 % Methanol, 25 mM Tris- HCl, pH 8,3
TBS- T Puffer	0,1 % Tween- 20 in TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl), pH 7,6
Blockpuffer	5 % Milchpulver in TBS-T
Nativer Lysispuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,0, 0,05 % Tween- 20, 10 mM NEM, 1x Proteaseinhibitor
weitere Puffer:	
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	3 mM NaH ₂ PO ₄ , 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 130 mM NaCl
TE- Puffer	0,01 M Tris- HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, pH 8,0

6 x DNA- Ladepuffer	20 % Glycerol, 60 mM EDTA, pH 8,0, 0,6 % SDS, 0,003 % Bromphenolblau
2x SDS- Puffer	0,125 M Tris- HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 0,15 M DTT, 20 % Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau
6x SDS- Puffer	20 % Glycerol, 60 mM EDTA, pH 8,0, 0,6 % SDS, 0,003 % Bromphenolblau

3.2 Medien

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium	DMEM full (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10 % FBS, 1 % Penicillin/ Streptomycin, PAA Laboratories GmbH, Cölbe/Deutschland
LB- Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
LB- Platte	LB- Medium + 2 % (m/v) Agar
SOC- Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 20 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 20 % Glucose
Calcium- Phosphat- Transfektionsmedium	DMEM, 2 % FBS, PAA Laboratories GmbH, Cölbe/Deutschland
Lipofectamine 2000- Transfektionsmedium	DMEM, PAA Laboratories GmbH, Cölbe/Deutschland

3.3 Molekularbiologische Reagenzien

Reagenz	Hersteller
dNTPs (100mM)	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St. Giles/GB
FastDigest Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich/Deutschland
FastDigest Green Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich/Deutschland
Proteinstandard	Fermentas/Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich/Deutschland
Dual- Proteinstandard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München/Deutschland
T4- DNA- Ligase	New England Biolabs inc., Ipswich/USA
T4- DNA- Ligasepuffer (10x)	New England Biolabs inc., Ipswich/USA

Zelllinien	
DH5α	Chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> - Stamm
HEK 293	Transformierte Humane Embryonale Nierenzellen
CSM 14.1	Immortalisierte Nigrostriatale Rattenzelllinie

Plasmide	Hersteller
pcDNA3.0	Invitrogen Life Technologies Corporation, Karlsruhe/Deutschland
His- SUMO2 in pcDNA3.0	zur Verfügung gestellt von Dr. Katrin Eckermann
His- SUMO2 Δ GG in pcDNA3.0	zur Verfügung gestellt von Dr. Katrin Eckermann
Tau-VC in pCMV	zur Verfügung gestellt von Dr. Ellen Gerhardt
VN-Tau in pCMV	zur Verfügung gestellt von Dr. Ellen Gerhardt
mVenus-Sumo2 in pcDNA3.0	zur Verfügung gestellt von Dr. Katrin Eckermann
GFP-Tau in pcDNA3.0	zur Verfügung gestellt von Dr. Katrin Eckermann

Primer:

Alle Primer wurden von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim/Deutschland) erworben.

Name	Sequenz
S2-VC fw	AAAAAACTTAAGATGTCCGAGGAGAA
S2-VC rv	TTTTTTCTCGAGCGCTGCCGTCTGCTGCTGGA A
VC-S2 fw2	AAAAAAGCTTCTTAAGATGAAGAACGGCATC AA
VC-S2 rv	TTTTTTGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCAT
Tau-VN fw1	AAAAAAAAGCTTGCTAGCATGGCTGAGCCCC GCCA
Tau-VN fw2	AAAAAAGGATCCGTGAGCAAGGGCGA
Tau-VN rv1	TTTTTTGGATCCCAAACCCTGCTTGGCCA
Tau-VN rv3	TTTTTTCTCGAGCTACTGCTTGTTCGGCGGTGA TAT

Antikörper	Hersteller
Anti-Tau Antibody (HT7)	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich/Deutschland
Anti- Rabbit- SUMO2	Invitrogen Life Technologies Corporation, Karlsruhe/Deutschland
GFP- C2	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz/USA
Sekundäre Antikörper:	
Goat- Anti- Mouse HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz/USA
Anti- Rabbit Cy3	Dianova, Hamburg/Deutschland
Anti- Mouse Cy3	Dianova, Hamburg/Deutschland

3.4 Material

Material	Hersteller
96- Well Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen/Deutschland
24- Well Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen/Deutschland
12- Well Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen/Deutschland
Objektträger 24x60 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig/Deutschland
Deckgläschen, Durchmesser 15 mm, 10 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig/Deutschland
Filterpapier	Whatman Ltd., GB
Nitrocellulosemembran	Schleicher & SchuellBioScience GmbH, Dassel/Deutschland
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen/Deutschland

Kits	Hersteller
BCA Proteinassay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich/Deutschland
QIAGEN® Plasmid Purification Kit	QIAGEN, Hilden/Deutschland
NucleoSpin Plasmid Kit	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren/Deutschland
PureLink PCR Purification Kit	Invitrogen Life Technologies Corporation, Karlsruhe/Deutschland
Platinum <i>Pfx</i> DNA Polymerase-Amplifizierungskit	Invitrogen Life Technologies Corporation, Karlsruhe/Deutschland
Super Signal West Pico chemiluminescentSubstrat	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich/Deutschland

3.5 Geräte

Geräte und Software	Hersteller
2000 TM UV- Transilluminator	Bio-Rad Laboratories GmbH, München/Deutschland
40- fach Objektiv	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena/Deutschland
Binokular- Stemi 2000	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena/Deutschland
BioRad Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München/Deutschland
BioRad Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München/Deutschland
Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland
Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland

DigitalcameraAxioCamHRm	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena/Deutschland
Electrophoresis Power Supply EV231	Consort, Turnhout/Belgien
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA Health Care, Köln/Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena/Deutschland
Heraeus Megafuge 1.OR	Heraeus Holding GmbH, Hannover/Deutschland
Hypercassette TM	AmershamBiosciences, Freiburg/Deutschland
Hyperfilme TM ECL TM	AmershamBiosciences, Freiburg/Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland
Microarray- Reader TECAN Rainbow	TECAN, Crailsheim/Deutschland
Mini- PROTEAN 3 Cell-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München/Deutschland
Neubauer Zählkammer	Hecht Assistent, Sondheim/Deutschland
Rotationsschüttler Rotator SB3	Stuart/Bibby Scientific Limited, Staffordshire, GB
Schüttler, Sky Line	ELMI Ltd., Riga/Lettland
Sicherheitssterilwerkbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, Hannover/Deutschland
Software AxioVersionSE64 Rel. 4.6	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena/Deutschland
Software easyWINbasic	TECAN, Crailsheim/Deutschland
Sonopuls HD 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin/Deutschland
Sorvall Super T21 (Zentrifuge)	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich/Deutschland
Stromgerät Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen/Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland

4 Methoden

Für die Untersuchung der Interaktion der Proteine Tau und SUMO wurden die Methoden der Immunpräzipitation und der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation angewendet. Es wurden zuerst Plasmidkonstrukte kloniert, die eine Durchführung der Methoden erlauben.

4.1 Klonierungstechniken

4.1.1 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Bevor eine Vervielfältigung der DNA stattfinden konnte, wurden spezifische Primer mit der Software GENTle designt und über die Firma Sigma Aldrich hergestellt. Diese Oligonukleotide enthielten spezifische Restriktionsschnittstellen von Enzymen, die für spätere Klonierungsschritte notwendig waren. Die Amplifizierung der DNA erfolgte mittels PCR in 30 Zyklen, wobei eine DNA- Menge von 200 ng eingesetzt wurde. Dauer und Temperatur der einzelnen Schritte wurden individuell für die verschiedenen Konstrukte gewählt. Ein Ansatz enthielt folgende Materialien:

200 ng	Template DNA
1 µl	Primer forward
1 µl	Primer reverse
1x	Pfx- Enhancer Puffer (10x)
1x	Pfx- Amplification Puffer (10x)
1 µl	dNTPs
0,5 µl	MgSO ₄ 50 mM
0,5 µl	Pfx- DNA- Polymerase
10 – 20 µl	H ₂ O

Ein PCR- Lauf begann mit der Initialisierung, bei der der Ansatz für fünf Minuten auf 94 °C erhitzt wurde. Dabei fand eine erste Denaturierung der DNA statt. Nach Ablauf der 30 Zyklen wurde das Gemisch für fünf Minuten auf 68 °C gebracht, um eine finale Elongation durchzuführen. Ein Zyklus der PCR erfolgte in folgenden Schritten:

Denaturierung	94 °C	30 sek
Primerhybridisierung	55 - 60 °C	30 sek
Elongation	68 °C	30 sek

Die Produkte der PCR wurden nach Anleitung der Firma Invitrogen aufgereinigt, bei der u.a. Primer, dNTPS und Salze entfernt worden.

4.1.2 Restriktion von Plasmid- DNA

Mit Hilfe von FastDigest Enzymen wurde eine Restriktion durchgeführt. Diese Enzyme erlauben eine rapide Spaltung mit kleiner Fehlerrate. Als Puffer wurde der 10 x FastDigest Green Buffer eingesetzt, der einen Doppelverdau erlaubt und direkt auf ein Agarosegel aufgetragen werden kann. Es wurden die aufgereinigten PCR- Produkte und Plasmid-DNA, in die die Fragmente integriert werden sollten, gespalten. Pro Ansatz wurden 1-3 µl Enzym eingesetzt und die Restriktion fand bei 37 °C für mindestens 40 Minuten statt. Bei den Vektoren wurde eine DNA- Menge von 3 µg eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Auftrennung auf einem Agarosegel.

4.1.3 Agarose- Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA- Fragmenten nach ihrer Größe wurde eine Agarose- Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden Gele hergestellt, die einen Agaroseanteil von 0,8 – 1,5 % besaßen. Dies war von der Fragmentgröße abhängig. Die Agarose wurde in 50 – 150 ml TBE- Puffer durch Kochen gelöst und nach Abkühlung mit Ethidiumbromid (0,07 µg/ml) versetzt. Nachdem sich das Gel in einem Gelträger verfestigt hatte, wurde es in eine mit TBE- Puffer gefüllten Gelkammer überführt. Die DNA- Proben wurden mit 5 x Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Um die Fragmentgröße bestimmen zu können, wurden DNA- Standardleitern parallel aufgetragen. Dabei wurden 100 bp- und 1 kb- Marker eingesetzt. Nach dem Lauf bei 100 V für ca. eine Stunde wurden die DNA- Banden mit Hilfe eines UV- Transilluminators dargestellt.

4.1.4 Gelextraktion von DNA- Fragmenten

Die Isolierung der gewünschten DNA- Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte mit dem Gel- Extraktionskit der Firma Invitrogen. Dafür wurden zuerst die Banden aus dem Gel geschnitten und das Agarosegel aufgelöst. Anschließend wurde die DNA über Silicamembranen isoliert und in Wasser eluiert.

4.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid- DNA

Um eine Religation der gespaltenen und aus dem Agarosegel isolierten Plasmid-DNA zu verhindern, fand eine Dephosphorylierung statt. Dafür wurde das Enzym Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) eingesetzt, das die 5'- Phosphatenden der linearisierten DNA entfernt. Pro Ansatz wurde ein Gemisch aus Plasmid- DNA, 1 x SAP- Puffer, Wasser und 2 µl Enzym hergestellt. Die Dephosphorylierung fand bei 37 °C für 30 Minuten statt. Anschließend wurde das Enzym bei 70 °C für 20 Minuten inaktiviert.

4.1.6 Ligation von DNA- Fragmenten

Die Methode der Ligation erlaubt die Zusammensetzung linearer Plasmid- DNA mit DNA- Fragmenten. Eine T4- DNA- Ligase, die aus einer T4- Phage stammt, fügt dabei geschnittene Enden unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen wieder zusammen und vollständige Plasmide entstehen. Für die Ligation wurden die PCR- Produkte mit den Vektoren in einem 3:1- Verhältnis gemischt. Dafür wurde zuvor die Konzentration der Proben mittels Biophotometer bestimmt. Zu dem Ansatz wurden 1x T4- DNA- Puffer und 1 µl T4-DNA- Ligase gegeben. Es wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl gewählt, das durch Hinzugeben von Wasser erreicht wurde. Die Ligation fand über Nacht bei 16 °C statt.

4.1.7 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Bei einer Transformation nehmen kompetente Zellen freie DNA ins Zellinnere auf und exprimieren diese. In dieser Arbeit wurden chemisch kompetente DH5α Zellen verwendet, die aus einer *Escherichia coli*- Linie stammen.

Zu 100 µl kompetenten Zellen wurden 5 µl Ligationsansatz gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend fand ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden statt. In dieser Zeit gelangt die DNA durch Porenbildung ins Innere der Zellen. Nach einer Inkubation auf Eis für zwei Minuten, wurden 500 µl SOC- Medium dazugegeben und für eine Stunde bei 30 °C und 600 rpm geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden die Bakterien pelletiert und in 100 µl SOC- Medium resuspendiert. Dieses Gemisch wurde auf LB- Agarplatten mit Zusatz von Ampicillin ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.1.8 Plasmidpräparation

Zur Isolierung der rekombinanten DNA aus Bakterienzellen wurden zwei Methoden eingesetzt. Zur schnellen Isolierung geringerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das NucleoSpin Plasmidkit von Machery & Nagel verwendet. Zuerst wurden 5 ml einer Übernachtskultur für 30 Sekunden bei 11,000 x g zentrifugiert, um ein Pellet zu erhalten. Dieses wurde dann nach Firmenangaben aufgearbeitet. Dabei wird das Prinzip der alkalischen Lyse angewendet, bei der durch Zugabe einer Base der pH- Wert stark verändert wird und die Zellen lysieren. Nach Neutralisation und Entfernung von Bestandteilen, wie chromosomale DNA und Proteine, kann die Plasmid- DNA über eine Silicamembran isoliert werden. Diese Art der Plasmidpräparation wurde eingesetzt, um die klonierten Konstrukte zu isolieren. Diese wurden anschließend zur Sequenzierung an die Firma SeqLab geschickt.

Um die rekombinante DNA in größeren Mengen zu erhalten, wurde eine Maxipräparation nach QIAGEN durchgeführt. Dafür wurden 250 ml einer Übernachtskultur aufgearbeitet. Das Prinzip beruhte ebenfalls auf einer alkalischen Lyse mit anschließender Isolierung der DNA über eine Silicamembran.

4.1.9 DNA- Präzipitation mittels Ethanolfällung

Die Präzipitation dient der Konzentrierung gewonnener DNA. Es wurde die Methode der Ethanol- Fällung angewendet, bei der durch Zugabe von Ethanol DNA ausgefällt wird und dadurch von anderen Bestandteilen separiert werden kann. Bei der Durchführung wurden zuerst 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat zu 1 Volumen Plasmid-DNA gegeben.

Weiterhin wurden zwei Volumen eiskaltes 100 % Ethanol untergemischt und bei 4 °C und 16100 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Bei diesem Schritt erfolgt die Fällung der DNA. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 70 %- igen Ethanol (1 Volumen) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für fünf Minuten wurde der Überstand abgenommen und das Pellet über Nacht bei 4°C in 1x TE- Puffer (pH 8,0) gelöst.

4.2 Zellkultur eukaryotischer Zellen

Als Zelllinie wurden Humane Embryonale Nierenzellen (HEK293) verwendet, die in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Zusatz von 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert worden. Die adhärent gewachsenen Zellen wurden nach Waschen mit 5 ml PBS durch Behandlung mit 1,5 ml Trypsin von der Oberfläche gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Abstoppen der Trypsinaktivität durch Zugabe von 5 ml Medium wurde die Suspension bei 1000 x g für vier Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen und das Zellpellet in Medium resuspendiert wurde, erfolgte die Überführung in eine neue 10 cm Zellkulturschale. Um eine definierte Zellzahl auszuplattieren, wurde eine Zellzählung durchgeführt. Das resuspendierte Zellgemisch wurde im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer fand eine Zellzählung unter dem Lichtmikroskop statt.

In dieser Arbeit wurde weiterhin mit CSM 14.1 Zellen gearbeitet. Diese immortalisierten nigrostriatalen Rattenzellen kommen im Mittelhirn vor. Die Handhabung erfolgte nach der Prozedur der HEK293 Zellen, jedoch unterschieden sich die Inkubationsbedingungen. Die CSM14.1 Zellen wurden bei 32 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.3. Transfektion eukaryotischer Zellen

Mit der Methode der Transfektion kann genetisches Material, wie z.B. Plasmide, in eukaryotische Zellen eingebracht werden und somit eine Expression der gewünschten Proteine stattfinden. Bei der Calcium- Phosphat- Transfektion wird die einzubringende DNA mit Calciumchlorid und einer phosphathaltigen Pufferlösung gemischt.

Dadurch kommt es zur Ausbildung feiner Kristalle, welche sich bei Zellkontakt auf der Oberfläche ablagern und durch Endozytose ins Innere aufgenommen werden.

Bei der Transfektion mit Lipofectamine 2000 bilden sich in wässriger Lösung kationische Liposomen, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA wechselwirken. Diese Komplexe lagern sich ebenfalls auf der Zelloberfläche ab und werden durch Endozytose in die Zelle gebracht.

4.3.1 Calcium- Phosphat- Transfektionsverfahren

Einen Tag vor Durchführung wurden HEK293 Zellen gesplittet und auf 24- Well- Mikrotiterplatten ausgesät. Es wurde eine Zelldichte von 50.000 gewählt. Zuvor wurden die Platten mit 10 mm-Deckgläschen präpariert. Diese wurden mit Ethanol abgeflammt und mit Gelatine beschichtet, indem 500 µl der Lösung auf die Deckgläschen gegeben wurden und nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde die Gelatine entfernt. Nach kurzem Antrocknen wurden die Deckgläschen mit PBS einmal gewaschen und mit Medium überdeckt.

Für die Transfektion erfolgte die Herstellung einer Suspension aus 1,6 µl 2,5 M Calciumchlorid, Wasser und DNA, wobei eine DNA- Menge von 1 µg eingesetzt wurde und das Gesamtvolumen 266,6 µl betrug. Zu dem Ansatz wurden 16,6 µl 2x HEPES- Buffered Saline (HBS) gegeben und für 50 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Reaktion wurde mit 266,6 µl DMEM mit Zusatz von 2% FBS gestoppt. Das alte Medium wurde von den Zellen entfernt und das Transfektionsgemisch hinzugegeben. Nach 12 – 14 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium durch DMEM full ersetzt und für weitere 24 h inkubiert.

Die Methode der Calcium- Phosphat- Transfektion wurde weiterhin im größeren Maßstab angewendet. Dafür wurden 10 cm- Zellkulturschalen mit 1,5 Millionen Zellen einen Tag vor Durchführung ausgesät. Für die Transfektion wurde eine DNA- Menge von 5 µg eingesetzt. Der Methodenablauf erfolgte wie beschrieben.

4.3.2 Lipofectamine 2000TM Transfektionsverfahren

Ein Tag vor Durchführung wurden Mikrotiterplatten mit sterilen 15 mm- Deckgläschen versehen und CSM14.1- Zellen mit einer Dichte von 50.000 und 1 ml DMEM full pro Well ausgesät. Für die Transfektion wurde das Medium mit 10 % FBS und 1 % P/S durch Medium ohne Zusätze ersetzt. Bei Durchführung des Experimentes wurden die Herstellerangaben befolgt. Es wurden 1,6 µg DNA und 2 µl Lipofectamine 2000 pro Well eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur, in der das Lipofectamine in 100 µl Medium ohne Zusätze gemischt wurde, fand eine weitere Inkubation für 20 Minuten statt. In dieser Zeit wurde die Lipofectaminelösung mit der DNA, die in 100 µl Medium ohne Zusätze gemischt wurde, zusammengebracht.

Anschließend wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben und für vier bis sechs Stunden bei 32 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumswechsel zu DMEM full und eine weitere Inkubation für 42 Stunden.

4.4 Nachweis sumoylierter Proteine mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Bei der Methode der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation werden zwei Teile eines getrennten Fluoreszenzproteins jeweils an ein zu untersuchendes Protein kloniert. Kommt es zur Interaktion dieser zwei Moleküle wird das fluoreszierende Protein vervollständigt und ein Signal ist detektierbar. In dieser Arbeit wurde mit dem Gelb-fluoreszierenden Protein (YFP) Venus gearbeitet, das eine Mutation des Grün-fluoreszierenden Proteins darstellt. Dieses eignet sich sehr gut für BiFC- Analysen, da es eine hohe Helligkeit besitzt und dessen Reifung schnell erfolgt. Venus wurde zwischen den Aminosäuren 158 und 159 geteilt und die Teilstücke als VN und VC bezeichnet, wobei VN für das N- terminale Ende des Proteins und VC für den C- terminalen Bereich steht. Es wurden verschiedene Konstrukte hergestellt, die die möglichen Bindungspaarungen erlauben.

Dabei wurde VN an Tau und VC an SUMO kloniert. Bei letzterem wurde eine Mutante (SUMO2dGG) des SUMO2 verwendet, dem das Doppel- Glycinmotiv entfernt wurde und somit eine kovalente Interaktion ausgeschlossen ist. Weiterhin wurde SUMO2 als Kontrolle genutzt, bei der eine Konjugation an Tau über das GG- Motiv erfolgen kann.

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation wurde in unterschiedlichen Zelllinien getestet. Zuerst wurden CSM14.1- Zellen mit verschiedenen Konstrukten transfiziert (siehe 4.3.2) und immuncytochemisch (siehe 4.6) aufgearbeitet. Weiterhin wurden HEK293- Zellen transfiziert (siehe 4.3.1) und ebenfalls immuncytochemisch (siehe 4.6) behandelt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan200 und der Software AxioVersionSE64 Rel. 4.6, indem mit verschiedenen Fluoreszenzkanälen Mikroskopiebilder erstellt worden. Zur Detektion der Fluoreszenz, die durch die Komplementation des geteilten Fluoreszenzproteins entsteht, wurde im GFP- Kanal gearbeitet.

Es wurden die durchschnittlichen Belichtungszeiten des GFP- Kanals erfasst, um die Intensität der Fluoreszenz beurteilen zu können. Zur Lokalisation der Proteine SUMO und Tau wurde im Cy3- Kanal gearbeitet.

4.5. Proteinchemische Techniken

Proteinchemische Methoden sind effiziente Systeme, um Proteine zu reinigen, zu konzentrieren oder zu detektieren. Mit Hilfe einer Polyacrylamid- Gelelektrophorese z.B. können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend detektiert werden.

4.5.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen

Zuerst wurden die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen und mit nativem Lysispuffer lysiert. Nachdem die Zellen in gekühlte Reaktionsgefäße übertragen worden, fand eine Homogenisierung für 5 - 30 Sekunden und 40 % Leistung mittels Sonifizierer statt. Eine anschließende vierminütige Zentrifugation bei 2000 rpm bewirkte das Absetzen der Zellfragmente. Die Proben wurden anschließend weiter aufgearbeitet (siehe 4.5.2) oder bei -80 °C gelagert.

4.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Um die Gesamtproteinkonzentration in den Proben zu ermitteln, wurde ein BCA- Assay durchgeführt. Durch einen Farbumschlag, der durch die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} im Alkalischen auftritt, wird anhand von Standardwerten photometrisch die Konzentration bestimmt.

Für die Messung wurde eine Standardreihe mit BSA und Wasser mit Konzentrationen von 40 – 0,625 µg/µl hergestellt. In eine 96- Well Mikrotiterplatte wurden je 4 µl der Standardwerte und 4 µl Probe pipettiert. Nach Herstellerangaben wurden die BCA- Lösungen A und B im Verhältnis 1:50 gemischt und 200 µl auf die Standardwerte und Proben gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben in einer Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Anhand der Standardwerte konnte eine Eichgerade erstellt und durch lineare Regression die Konzentration der Proben berechnet werden.

Nachdem die Gesamtmenge an Proteinen bekannt war, wurde ein Gemisch aus Wasser, Protein und 6x- SDS- Puffer hergestellt. Diese Lösung wurde bei 95 °C für fünf Minuten gekocht und konnte in diesem Zustand auf ein Gel geladen werden.

4.5.3 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat (SDS) – Polyacrylamid- Gelelektrophorese nach Laemmli. Dabei werden die Proteine vor der Auftrennung denaturiert, indem sie mit SDS versetzt werden und bei 95 °C gekocht werden. Die Bindung von SDS an Proteine bewirkt die Aufhebung der Eigenladung der Proteine, da dieser Stoff negativ geladen ist und eine einheitliche Ladung der Proben entsteht. Die Auftrennung erfolgt somit nur nach Größe.

Für die Durchführung der PAGE wurden Zweiphasengele verwendet, die sich aus einem 4 %- igen Sammelgel und einem 8 %- igen Trenngel zusammensetzten. Dabei erfolgte eine pH- Wertänderung von 6,8 auf 8,8.

Die in SDS- Puffer gekochten Proben wurden auf das Gel gebracht. Um das Molekulargewicht der Proteine zu bestimmen, wurde ein vorgefärbter Proteinmarker parallel aufgetragen. Bei einer anfänglichen Spannung von 80 Volt wurde ein Einlaufen der Proben in das Sammelgel garantiert. Anschließend wurden die Proteine bei Raumtemperatur und einer konstanten Spannung von 100 Volt getrennt. Als die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die PAGE gestoppt.

4.5.4 Western Blot- Analysen auf Nitrocellulosemembranen

Um die aufgetrennten Proteine immunologisch zu detektieren, müssen diese zuerst auf eine Trägermembran übertragen werden. Dafür fand ein Western Blot im Tanksystem statt. Durch Platzierung der Nitrocellulosemembran und des Gels zwischen zwei Filterpapieren kann ein Transfer durch Anlegen einer Spannung stattfinden. Alle Komponenten des Western Blots wurden vorher in Transferpuffer getränkt.

Die Übertragung erfolgte bei 100 Volt für 1 - 1,5 h. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T + 5 % Magermilchpulver geblockt, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern.

Danach erfolgte die Behandlung mit dem primären Tau- Antikörper HT7. Dieser wurde mit einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T gemischt und eine Inkubation über Nacht bei 4 °C garantierte die Bindung an die Proteine. Um den primären Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde diese mit TBS-T gewaschen und der sekundäre Antikörper Goat- Anti- Mouse HRP hinzugegeben. Dieser wurde 1:4000 in 5 % Milchpulver + TBS-T verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Membran erneut gewaschen und mittels des Zweikomponentensystems Super Signal West Picochemiluminescent Substrat von Thermo Scientific wurden die Banden detektiert. Dafür wurden die ECL- Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und für drei Minuten auf der Membran inkubiert. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit Autoradiographiefilmen

4.6 Immuncytochemische Färbung eukaryotischer Zellen

Transfizierte CSM14.1- Zellen wurden 36 – 48 Stunden nach Transfektion mit PBS gewaschen und mittels 4 % - Paraformaldehyd-PBS für 15 Minuten fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für fünf Minuten in 0,1 % Triton X100/PBS inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Inkubation für zehn Minuten mit 50 mM Glycin/PBS. Nachdem die CSM14.1- Zellen einmal mit PBS gewaschen worden, fand ein Blocken mit 5 % NGS, 1 % BSA in PBS für 1 h und Raumtemperatur statt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in 2 % NGS/PBS. Es wurden spezifische SUMO- und Tau- Antikörper verwendet. Nach dreimaligem Waschen der Zellen wurden diese mit Cy3 gekoppelten sekundären Antikörpern behandelt und für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Anschließend fanden wieder drei Waschschritte statt.

Zum Schluss wurden die Zellen mit DAPI gefärbt, indem diese für 1 Minute mit der Lösung versetzt und anschließend mit PBS dreimal gewaschen worden. Die Deckgläschen wurden mit Fluoromount auf Objektträger gebracht und bei 4 °C verwahrt.

5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interaktion der Proteine Tau und SUMO untersucht werden. Dabei lag die Präferenz bei der Charakterisierung der nicht- kovalenten Interaktion, da die kovalente Bindung von SUMO an Tau bereits gezeigt wurde. Es wurde die Methode der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation angewendet, welche zuerst optimiert werden musste. Nachdem ein funktionierendes System etabliert werden konnte, erfolgten verschiedene Tests zur Lokalisation der Proteine.

5.1 Test der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation als Nachweismethode der Interaktion von Tau und SUMO

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation stellt eine Methode zum Nachweis der Interaktion von Proteinen dar. Dabei wird ein geteiltes Fluoreszenzprotein vervollständigt, wodurch ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Um diese Methodik anwenden zu können, müssen zuerst geeignete DNA- Konstrukte hergestellt und diese auf ihre Funktionalität getestet werden.

5.1.1 Test der klonierten Konstrukte

Damit eine Charakterisierung der Interaktion von Tau und SUMO erfolgen konnte, wurden zuerst verschiedene Konstrukte kloniert. Dafür wurden in einen Vektor, der einen CMV- Promotor enthielt, die gewünschten DNA- Fragmente integriert. Da die Konformation der Proteine während einer Interaktion unbekannt ist, wurden die geteilten Enden von Venus jeweils am N- und C- Terminus von Tau und SUMO kloniert, wobei das Konstrukt VN- Tau von Dr. Ellen Gerhardt zur Verfügung gestellt wurde. Es wurde eine Mutante von SUMO2 verwendet, bei der das Doppel- Glycin- motiv entfernt wurde, um eine kovalente Interaktion auszuschließen. Weiterhin wurde in einer Kombination SUMO2 genutzt.

Für die Experimente wurde die effektivste Kombination untersucht und für anschließende Nachweise genutzt. In folgender Übersicht sind die verwendeten Konstrukte dargestellt.

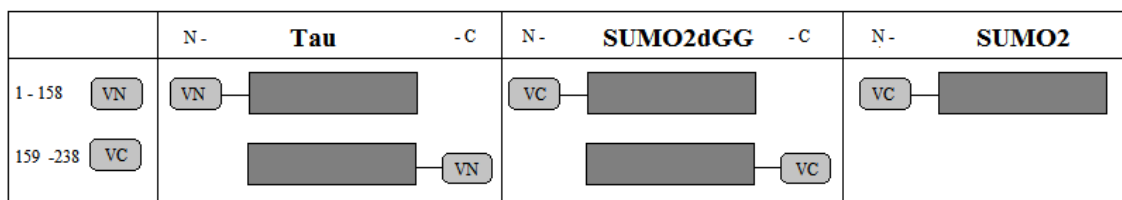


Abbildung 9 Klonierungsübersicht der Tau- / SUMO- BiFC- Konstrukte

Das gelb- fluoreszierende Protein Venus wurde an der Stelle 158 gespalten und als VN und VC bezeichnet. Der N- Terminus des Proteins wurde an Tau kloniert und der C- Terminale Bereich an SUMO2 und dessen Mutante SUMO2dGG. Die Venusfragmente wurden jeweils an die Enden von Tau und SUMO gehangen. Die Kombination VN- Tau wurde von Dr. Ellen Gerhardt zur Verfügung gestellt. Für eine Kontrolle wurde VC an den N- Terminus von SUMO2 kloniert.

Um die verschiedenen Konstrukte auf eine Interaktion zu testen, die eine Fluoreszenz hervorbringt, wurden immuncytochemische Färbungen angefertigt. Dafür wurden CSM14.1 Zellen in 12- Well Mikrotiterplatten mittels Lipofectamine 2000 transfiziert und anschließend nach einer Fixierung mit Paraformaldehyd und Anfärbung des Nukleus mit DAPI auf Objektträger gebracht. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops konnte dann im GFP- Kanal ein Signal detektiert werden. Alle gewählten Kombinationen zeigen eine Fluoreszenz. Diese Paarungen wurden ebenfalls in HEK293 getestet. Es konnte ebenfalls bei allen Kombinationen eine Fluoreszenz detektiert werden.

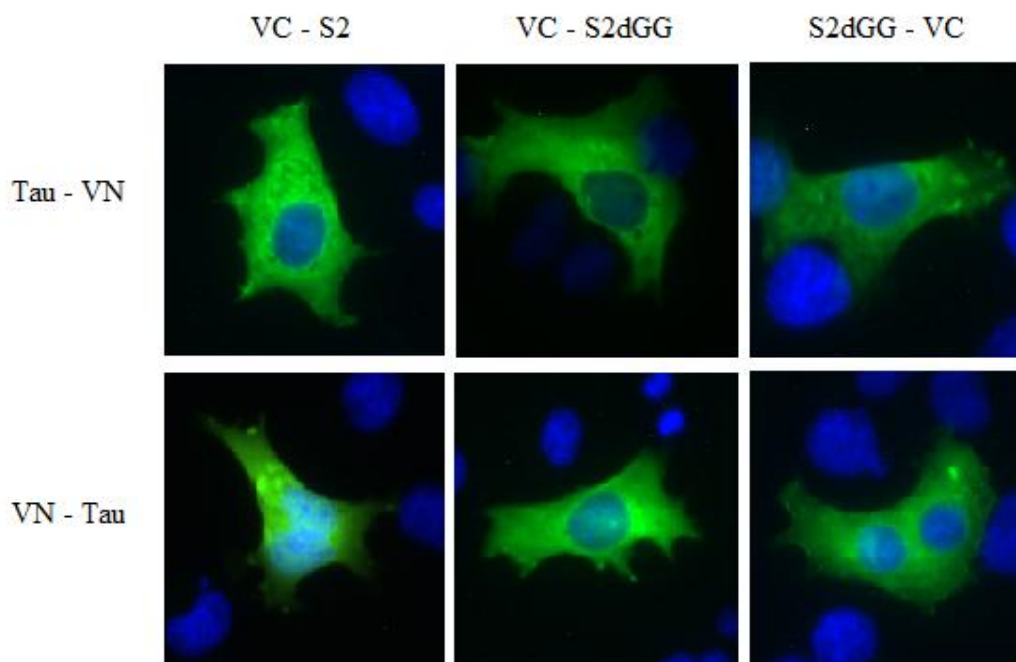


Abbildung 10 Übersicht der möglichen Kombinationen zur Bildung eines BiFC- Komplexes

CSM14.1 Zellen wurden 48 h nach Transfektion fixiert und immuncytochemisch aufgearbeitet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Alle Kombinationen zeigen eine gleichmäßige Fluoreszenz.

Um die Expression der Konstrukte in Zellen beurteilen zu können, wurden HEK293 Zellen mit den Kombinationen transfiziert. Von den Proben wurden Lysate angefertigt, die nach einer Messung der Gesamtproteinkonzentration mittels SDS- PAGE aufgetrennt worden. Anschließend erfolgte ein Western Blot mit Immundetektion. Die Banden wurden mit dem primären Tau- Antikörper HT7 detektiert. Anhand der Abbildung wird deutlich, dass die Kombinationen mit VN- Tau eine stärkere Expression hervorruft als bei Tau- VN. Innerhalb der Bedingungen ist die Expression der Kombinationen VC-S2dGG und S2dGG- VC mit Tau ungefähr gleich stark. Die Einzeltransfektionen VN- Tau und Tau- VN zeigen große Unterschiede in der Stärke, wobei eine erhöhte Expression bei Tau- VN zu sehen ist. Alle Banden liegen bei ca. 95 kDa, was dem apparenten Molekulargewicht von Tau (72 kDa) und dem N-Terminalen Bereich von Venus VN (18 kDa) entspricht.

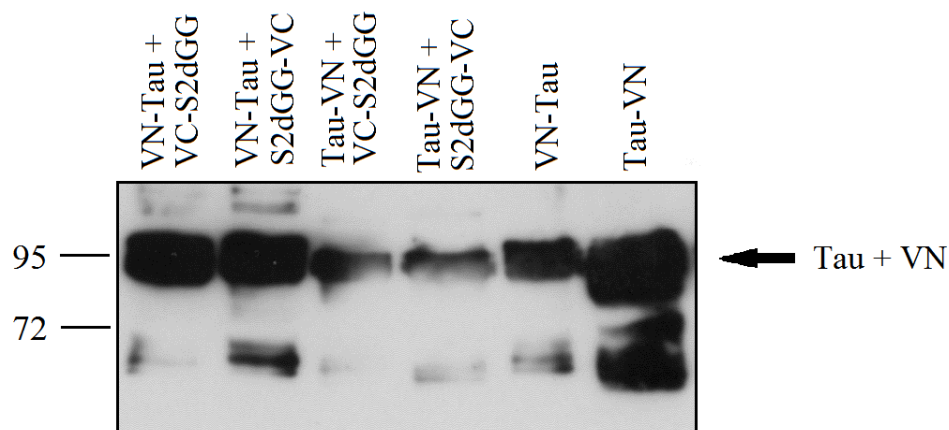


Abbildung 11 Vergleich der Expression der unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten der BiFC- Konstrukte

HEK293 Zellen wurden mit unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten der klonierten Konstrukte transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit den Einzelproben VN- Tau und Tau- VN transfiziert. Nach der Lyse der Zellen wurde die Gesamtproteinkonzentration bestimmt und 40 µg Protein mittels SDS- PAGE und Western Blot- Verfahren aufgearbeitet. Mit dem Tau- Antikörper HT7 wurden die Banden detektiert. In allen Bedingungen war ein Konstrukt, das Tau und VN enthält, detektierbar (Pfeil). Die Kombinationen mit VN-Tau zeigten eine stärkere Expression als Tau-VN. Die Einzelprobe Tau-VN wies das größte Expressionslevel auf.

Für die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten wurden die Belichtungszeiten im GFP- Kanal erfasst. Somit konnte ein Vergleich der Fluoreszenzintensität für die Tau- und SUMO2dGG- Konstrukte vorgenommen werden, da anhand der Zeiten eine ungefähre Abschätzung der Intensitäten möglich ist. Es zeigte sich, dass die Kombination VN- Tau mit VC- SUMO2dGG eine kürzere Belichtungszeit benötigte als die anderen (siehe Anhang). Daher wurde für die Untersuchung der Lokalisationen diese Kombination verwendet.

5.1.2 Kontrollen

In Kontrollversuchen wurden die Konstrukte einzeln transfiziert und auf eine Fluoreszenz getestet. Dadurch sollte überprüft werden, ob eine Fluoreszenz nur dann detektiert wird, wenn beide Interaktionspartner gleichzeitig in der Zelle exprimiert werden. Dafür wurden CSM14.1 Zellen verwendet, in die mittels Lipofectamine-Transfektion die gewünschte DNA eingebracht wurde. Nach immunocytochemischer Aufarbeitung, bei der die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt worden, konnten die Proben mikroskopiert werden. Es zeigte sich kein Fluoreszenzsignal im GFP- Kanal, trotz maximaler Belichtungszeit.

Um sicher zu stellen, dass die Transfektion erfolgreich war, wurden die Zellen mit Tau- bzw. SUMO- spezifischen Antikörpern behandelt. Der sekundäre Antikörper war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelt, wodurch eine Detektion möglich wurde. In den Abbildungen wird deutlich, dass keine Fluoreszenz, die durch ein funktionsfähiges Fluorophor eines Fluoreszenzproteins entsteht, vorhanden ist. Im Merge zeigt sich, dass die Zellen die transfizierten Proteine enthalten.

Eine Positivkontrolle wurde durch die Kombination mit dem Konstrukt VC- SUMO2 gewährleistet, da eine Konjugation zwischen Tau und SUMO angenommen wird. Im Mikroskopiebild zeigt sich eine deutliche Fluoreszenz, die durch die Kombination der Proteine und somit einer Komplementation von Venus entsteht.

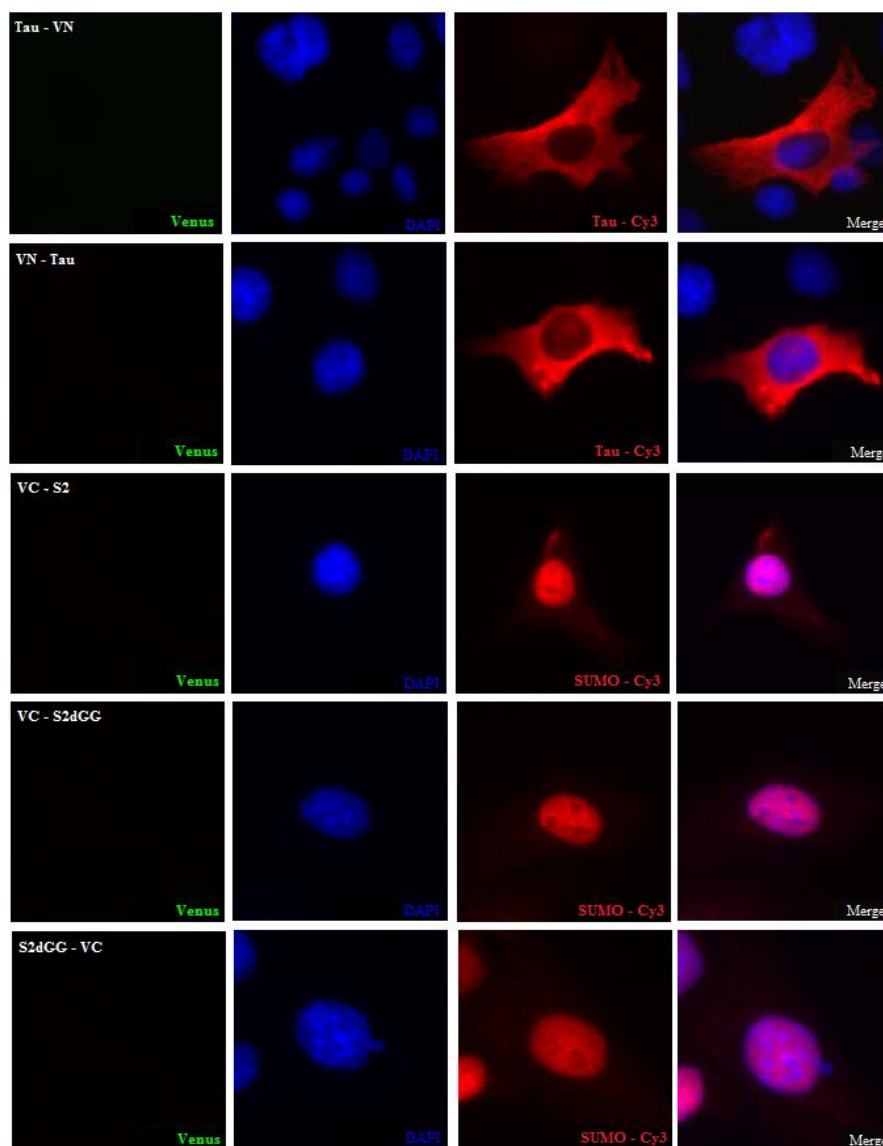


Abbildung 12 Test der klonierten Konstrukte auf eine alleinige Fluoreszenz

Für die Kontrolle wurden CSM14.1 Zellen mit der Plasmid- DNA transfiziert und nach 48 h mit Paraformaldehyd fixiert. Die Kombinationen Tau- VN und VN- Tau wurden mit dem primären Antikörper HT7 gefärbt. Die Konstrukte VC- S2, VC- S2dGG und S2dGG- VC wurden mit einem Rabbit- Anti- SUMO2 Antikörper detektiert. In allen Bedingungen ist bei maximaler Belichtungszeit (40 s) keine Fluoreszenz im GFP- Kanal erkennbar.

5.2 Untersuchung der Interaktion von Tau und SUMO in CSM14.1 – Zellen

Es wurde mit den Konstrukten VN- Tau und VC- S2dGG gearbeitet. Weiterhin wurde als Kontrolle VC- S2 genutzt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen immuncytochemisch aufgearbeitet und mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine Auswertung erfolgen.

5.2.1 Lokalisation von Tau in neuronalen Rattenzellen

Tau stellt ein natürlich ungefaltetes Protein dar, das in neuronalen Zellen an Mikrotubuli bindet und diese stabilisiert. Zur Untersuchung der Lokalisation wurden CSM14.1 Zellen mit dem Konstrukt VN- Tau transfiziert und mittels spezifischem Tau-Antikörper detektiert. Weiterhin wurde in einer anderen Bedingung das Plasmid GFP- Tau in die Zellen gebracht. Bei diesem Konstrukt ist ein vollständiges Grün-Fluoreszierendes Protein an Tau gebunden. Dadurch ist ein Vergleich der Lokalisation von Tau möglich, wenn es an ein komplettes Fluoreszenzprotein gekoppelt ist oder nur an einen Teil von Venus.

In den Abbildungen ist zu sehen, dass Tau im Cytoplasma lokalisiert und dort gleichmäßig verteilt ist. Weiterhin wird deutlich, dass Tau in einigen Zellen verstärkt um den Zellkern auftritt. Bei der Kombination GFP- Tau ist das Protein ebenfalls gleichmäßig im Cytoplasma verteilt.

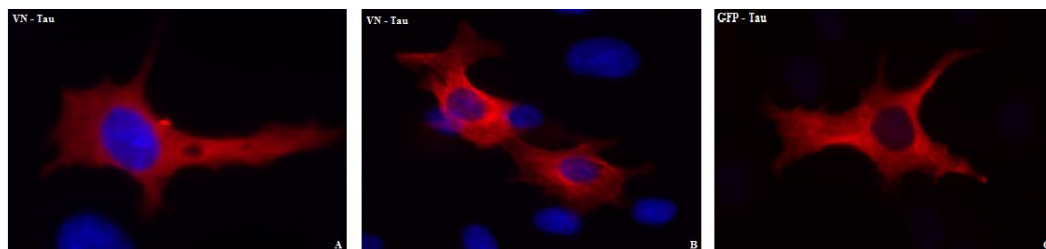


Abbildung 13 Lokalisation von Tau in CSM14.1 Zellen

Die Lokalisation wurde durch Behandlung mit dem primären Tau- Antikörper HT7 detektiert. Anhand eines Cy3 markierten sekundären Antikörpers konnte ein Fluoreszenzsignal erzeugt werden. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Bedingungen mit VN- Tau (A + B) und GFP- Tau (C) transfiziert.

A: Tau ist gleichmäßig im cytoplasmatischen Raum verteilt. B: In einigen Zellen ist Tau verstärkt im pernukleären Raum zu finden. C: Wenn Tau an ein vollständiges Fluoreszenzprotein gebunden ist, kann es trotzdem im Cytoplasma nachgewiesen werden.

5.2.2 Lokalisation von SUMO in neuronalen Rattenzellen

Der Small- Ubiquitin- Like Modifier spielt eine wichtige Rolle bei der Modifikation anderer Proteine und ist in viele Zellmechanismen involviert. Für die Untersuchung des Expressionsortes von SUMO wurden neuronale CSM14.1 Zellen transfiziert und mittels Immuncytochemie aufgearbeitet. Durch die Behandlung mit spezifischen Antikörpern wurde das Protein detektiert. Zum Einen wurde ein SUMO- spezifisches Immunglobulin genutzt, das exprimiertes SUMO erkennt (Rabbit- Anti- SUMO2).

Zum Anderen wurde ein GFP- Antikörper verwendet, der an das C- Terminale Ende eines Fluoreszenzproteins bindet (GFP- C2). Es wurde die Lokalisation von SUMO mit dem Konstrukt VC-S2dGG untersucht. Weiterhin fand ein Vergleich zu VC-S2 und zu mVenus- SUMO2 statt, um mögliche Lokalisationsänderungen durch das gesplittete Venus oder die SUMO- Mutante zu beurteilen. Bei mVenus- SUMO2 handelt es sich um eine Kombination, bei der ein vollständiges Venus an die SUMO- Isoform 2 kloniert wurde. In allen Bedingungen konnte SUMO im Zellkern nachgewiesen werden.

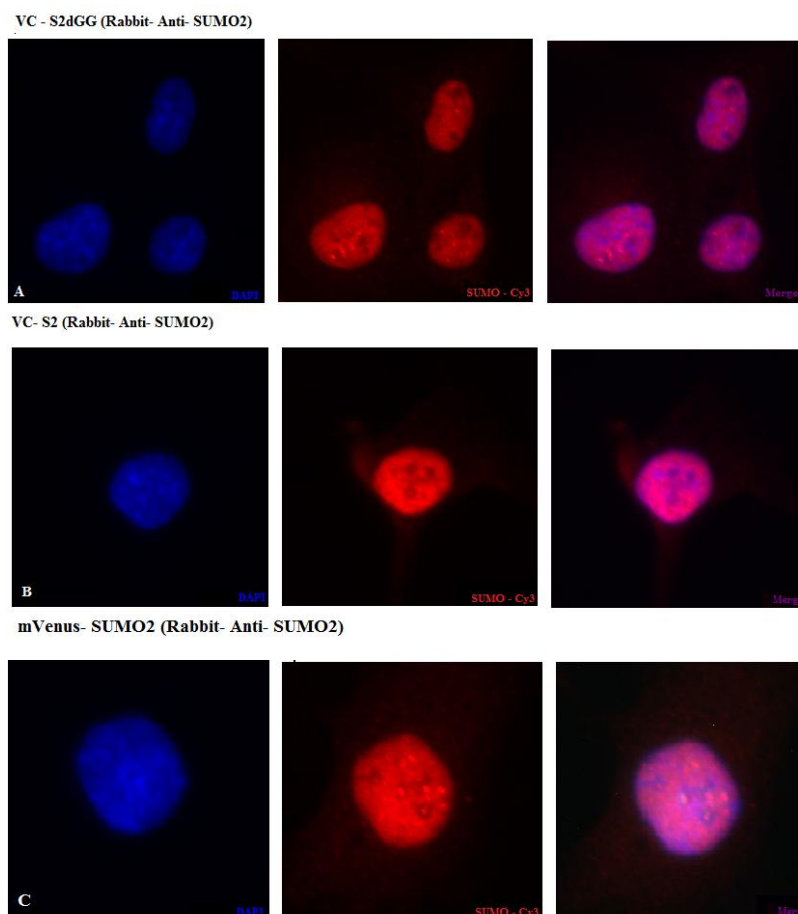


Abbildung 14 Lokalisation von SUMO in CSM14.1 Zellen

Die CSM14.1 Zellen wurden 48 h nach Transfektion fixiert und mittels SUMO- spezifischem Antikörper (Rabbit- Anti- SUMO2) behandelt. Zur Detektion diente ein Cy3 markierter sekundärer Antikörper. Es wurde das Konstrukt VC- S2dGG genutzt. Zusätzlich wurden die Plasmide VC- S2 und mVenus- SUMO2 als Vergleich transfiziert. In allen Bedingungen konnte das Protein im Nukleus nachgewiesen werden.

Es zeigten sich einige Auffälligkeiten bei der SUMO- Färbung. Der GFP- C2 Antikörper detektierte den Small- Ubiquitin- Like Modifier außerhalb des Zellkerns (Abbildung 15, B), wobei eine Präferenz zum Nukleus gegeben war. Diese Auffälligkeit konnte bei VC- S2dGG und VC- S2 nachgewiesen werden. Weiterhin war in einigen Zellen eine starke SUMO- Färbung im Cytoplasma festzustellen (Abbildung 15,A).

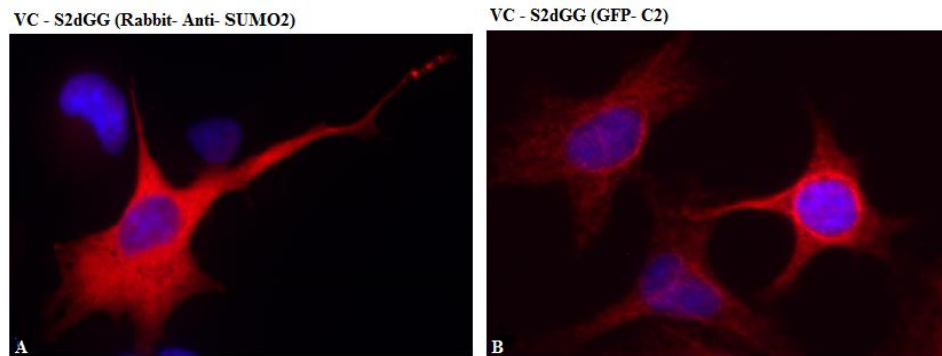


Abbildung 15 Auffälligkeiten der SUMO- Färbung in CSM14.1 Zellen

Die Zellen wurden mit VC- S2dGG transfiziert und immuncytochemisch behandelt. Als Antikörper wurden der Rabbit- Anti- SUMO2 (A) und der GFP- C2 (B) eingesetzt. Ersterer detektiert SUMO. Der GFP- Antikörper erkennt das C- Terminale Ende eines Fluoreszenzproteins. A: SUMO befindet sich vollständig im Cytoplasma. B: Der GFP- C2 Antikörper detektierte SUMO im Cytoplasma, wobei ein verstärktes Auftreten im perinukleären Raum zu finden ist.

5.2.3 Lokalisation der Interaktionspartner SUMO und Tau in neuronalen Rattenzellen

CSM14.1. Zellen wurden mit den Konstrukten VN-Tau und VC-S2dGG cotransfiziert und wie beschrieben immuncytochemisch behandelt. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop. Zeigten die Zellen eine alleinige Fluoreszenz im GFP- Kanal wurde ein Bild angefertigt. Gleichzeitig wurden Bilder im Cy3- Kanal aufgenommen, um die Lokalisation von Tau bzw. SUMO zu untersuchen. Als Kontrolle wurde VC- S2 mit VN- Tau transfiziert. In Abbildung 16 wird deutlich, dass sumoyliertes Tau im Cytoplasma zu finden ist, da eine grüne Fluoreszenz detektiert werden konnte. Dabei ist eine gleichmäßige Verteilung von Tau im Cy3- Kanal zu sehen. Anhand der Einzelbilder zeigt sich, dass Tau in einigen Zellen verstärkt im perinukleären Raum sumoyliert wird, da eine hellere Fluoreszenz vorliegt. Im Merge wird deutlich, dass die Lokalisation von Tau mit der grünen Fluoreszenz übereinstimmt.

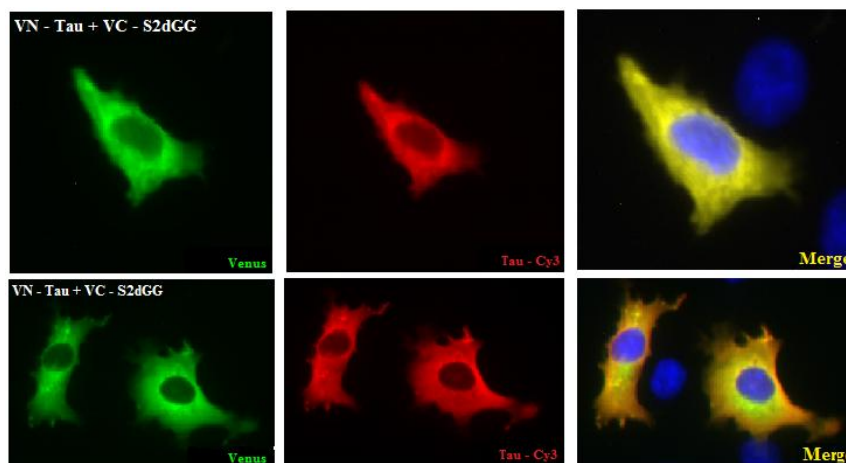


Abbildung 16 Lokalisation von sumoyliertem Tau in der Kombination VN- Tau + VC- S2dGG

Die Zellen zeigen eine deutliche Fluoreszenz im GFP- Kanal. Dafür wurden die CSM Zellen mit den BiFC- Konstrukten VN- Tau und VC- S2dGG transfiziert. Die Anfärbung von Tau erfolgte mit dem Antikörper HT7. Im Merge wird die Übereinstimmung der Fluoreszenz deutlich. Ein grünes Leuchten ist in der Zelle am Aufenthaltsort von Tau zu finden. In einigen Zellen tritt ein verstärktes Auftreten von sumoyliertem Tau in der Nähe des Zellkernes auf.

Zum Vergleich wurde die Kombination VC- S2 mit VN- Tau transfiziert. Auch hier zeigt sich eine Verteilung von sumoyliertem Tau im Cytoplasma, wobei ebenfalls eine Präferenz zum Zellkern erkennbar ist.

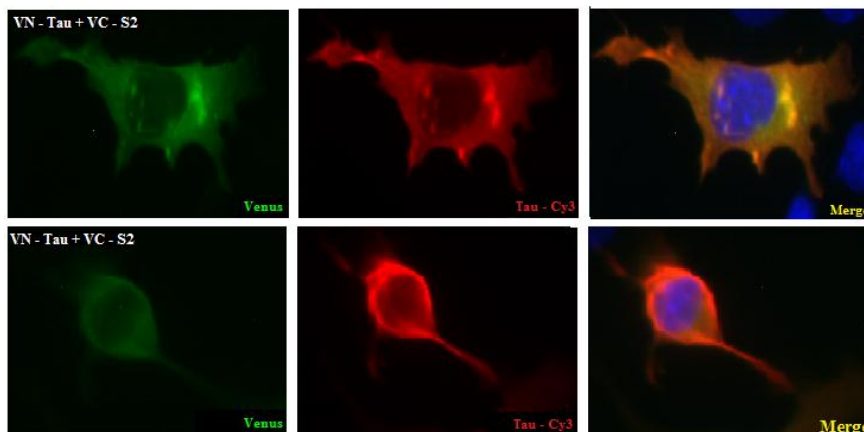


Abbildung 17 Lokalisation von sumoyliertem Tau in der Kombination VN- Tau + VC- S2

Die transfizierten Zellen zeigen eine Fluoreszenz im GFP- Kanal. Im Cy3- Kanal kann Tau überall im Cytoplasma detektiert werden. Die CSM14.1 Zellen wurden dafür mit den Konstrukten VN- Tau und VC- S2 transfiziert. Eine verstärkte grüne Fluoreszenz ist im perinukleären Raum nachzuweisen, welche mit dem erhöhten Auffinden von Tau in dieser Region übereinstimmt.

Weiterhin wurde die Lokalisation von SUMO in den BiFC- Komplexen untersucht. Es zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung von Venus im GFP- Kanal. Jedoch konnte eine erhöhte SUMO- Konzentration im perinukleären Raum detektiert werden (Abbildung 18, A), die im Merge nicht zu einer Gelbfärbung führt.

Weiterhin wird deutlich, dass wenig bzw. gar kein SUMO im Zellkern zu finden ist (Abbildung 18, B). Anhand der Merge- Abbildung zeigt sich ein Übereinstimmen der Lokalisation von SUMO mit der grünen Fluoreszenz.

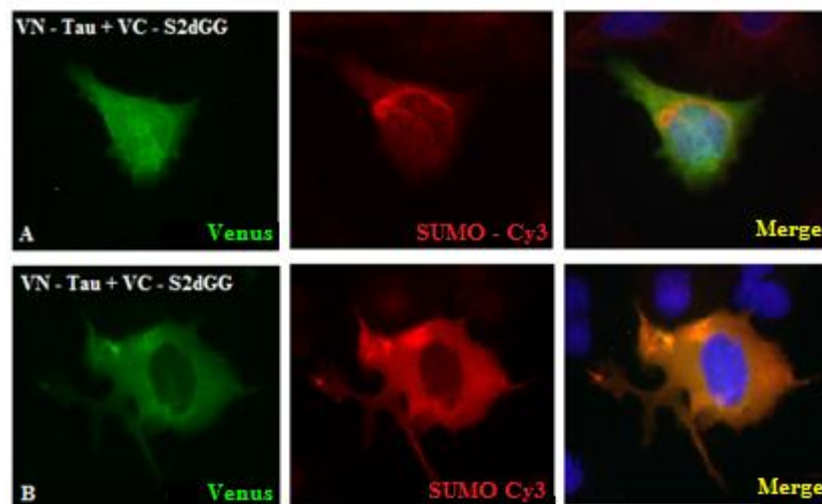


Abbildung 18 Lokalisation von SUMO in den BiFC- Komplexen VN- Tau + VC- S2dGG in neuronalen Zellen

Es wurden die Kombinationen VN- Tau und VC- S2dGG cotransfiziert. Nach Fixierung der CSM14.1 Zellen erfolgte eine Behandlung mit den primären Antikörpern GFP- C2 (A) und Rabbit- Anti- SUMO2 (B). Es ist eine deutliche grüne Fluoreszenz erkennbar. Diese stimmt mit der Lokalisation von SUMO überein. Zusätzlich konnte der Small- Ubiquitin- Like Modifier verstärkt im perinukleären Raum detektiert werden (A).

Als Kontrolle wurde VN- Tau mit VC- S2 cotransfiziert. Bei der mikroskopischen Auswertung zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz im GFP- Kanal. Diese tritt verstärkt um den Nukleus auf (Abbildung 19, B). Die SUMO- Detektion erfolgte mit dem Antikörper Rabbit- Anti- SUMO2. Es zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung von SUMO im Cytoplasma, wobei eine Tendenz zum Zellkern hin zu sehen ist. Im Merge ist zu erkennen, dass der Aufenthaltsort von SUMO mit der grünen Fluoreszenz übereinstimmt.

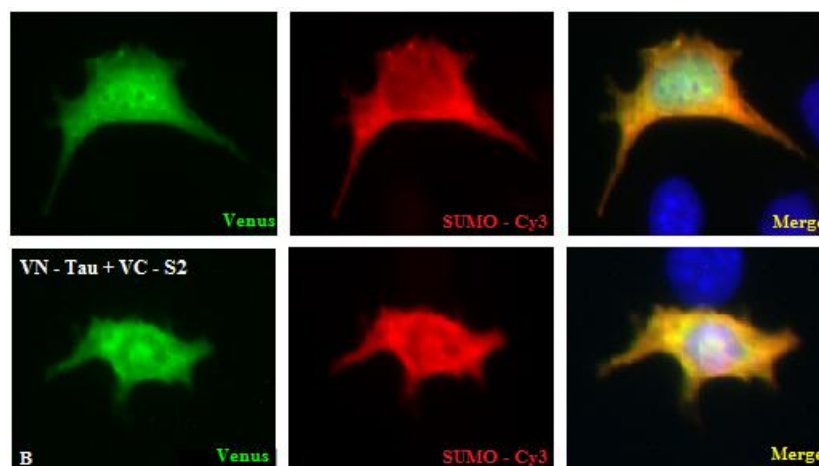


Abbildung 19 Lokalisation von SUMO in den BiFC- Komplexen VN- Tau + VC- S2 in neuronalen Zellen

Die CSM14.1 Zellen wurden mit VN- Tau und VC- S2 transfiziert und mittels Immunocytochemie wurde SUMO mit dem Antikörper Rabbit- Anti- SUMO2 detektiert. Es ist eine deutliche Fluoreszenz im GFP-Kanal erkennbar, welche eine größere Intensität im perinukleären Raum aufweist (A). SUMO ist überall im Cytoplasma zu finden, wobei es auch verstärkt um den Nukleus zu finden ist (B). Im Merge zeigt sich eine Übereinstimmung der Lokalisation von SUMO und der grünen Fluoreszenz.

Anhand der durchschnittlichen Belichtungszeiten des GFP- Kanals wird deutlich, dass die Kombination mit VC- S2 eine geringere Belichtungszeit benötigt, um ungefähr die gleiche Fluoreszenzintensität wie der BiFC- Komplex mit VC- S2dGG zu erreichen.

Weiterhin zeigten sich bei der mikroskopischen Auswertung einige Auffälligkeiten bei der Verteilung der Proteine in der Zelle. So konnte teilweise sumoyliertes Tau verstärkt in den Enden von Zellfortsätzen beobachtet werden. In der Abbildung 20, A wurden die Zellen mit dem Tau- Antikörper HT7 behandelt. Dieser detektierte das Protein im cytoplasmatischen Raum mit einem erhöhten Auftreten an der Plasmamembran der Zelle. SUMO konnte ebenfalls in diesen Regionen detektiert werden. In Abbildung 20, B wird dies deutlich. Diese Auffälligkeiten traten gehäuft bei der Kombination mit der SUMO- Mutante auf, wobei auch bei SUMO2 dieses Erscheinungsbild zu beobachten war.

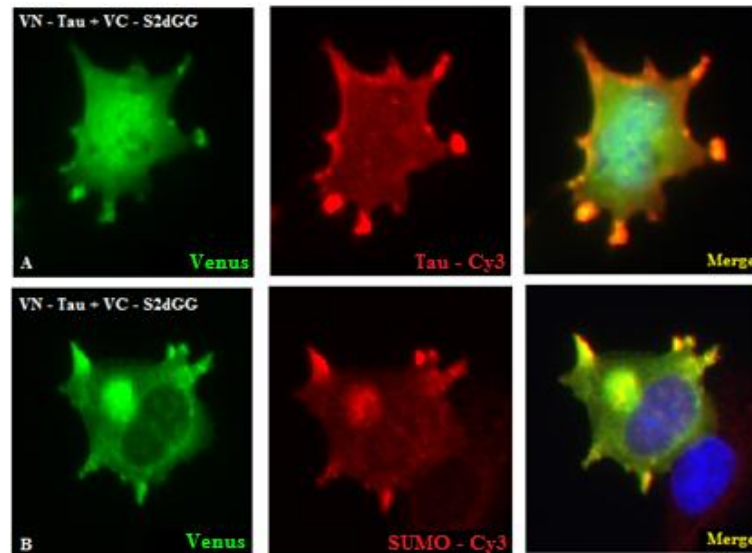


Abbildung 20 Besonderheiten der Lokalisation von sumoyliertem Tau in neuronalen Zellen

Die Zellen wurden mit den Konstrukten VN- Tau und VC- S2dGG cotransfiziert. Als Antikörper wurden der Tau- Antikörper HT7 (A) und der GFP- Antikörper GFP- C2 (B) eingesetzt. In beiden Bildern zeigt sich ein verstärktes Auffinden der Proteine an den Enden der Zellen. Diese Lokalisationen stimmen mit der grünen Fluoreszenz überein.

5.3 Untersuchung der Interaktion von Tau und SUMO in HEK293 – Zellen

Um die Interaktion der Proteine zu charakterisieren wurde eine weitere Zelllinie getestet. Dabei handelt es sich um Humane Embryonale Nierenzellen, die durch ihre Einfachheit bei der Kultivierung und Transfektion vielfältig einsetzbar sind. Als Konstrukte wurden VN- Tau mit VC- S2dGG transfiziert. Als Kontrolle diente VC-S2.

5.3.1 Lokalisation von Tau in humanen Nierenzellen

Das Mikrotubuli- Assoziierte Protein Tau ist v.a. in Axonen zu finden. Es kann aber auch in Zelllinien wie HEK293 Zellen exprimiert werden, um Nachweise durchzuführen.

Zur Untersuchung der Lokalisation wurde das Konstrukt VN- Tau transfiziert und mittels Tau-Antikörper HT7 konnte das Protein detektiert werden.

Es zeigte sich, dass Tau im cytoplasmatischen Raum zu finden ist. In vielen Zellen ist ein erhöhtes Auffinden im perinukleären Raum zu sehen (Abbildung 21).

Zum Vergleich wurde GFP- Tau in HEK Zellen transfiziert und ebenfalls mit einem Tau- Antikörper behandelt. Die Expression ist am gleichen Ort zu finden, wie das Konstrukt VN- Tau.

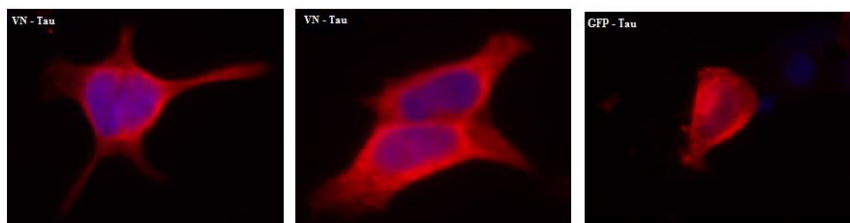


Abbildung 21 Lokalisation von Tau in HEK293 Zellen

Humane Embryonale Nierenzellen wurden mit dem Konstrukt VN- Tau transfiziert. Nach Fixierung der Zellen in Paraformaldehyd wurden sie mit dem Primärantikörper HT7 behandelt. Eine Detektion erfolgte mittels Cy3 markierten Sekundärantikörper. Tau ist im Cytoplasma zu finden, wobei eine Tendenz zum Nukleus besteht. Als Vergleich wurde GFP- Tau transfiziert. Dieses ist ebenfalls in diesen Regionen nachzuweisen.

5.3.2 Lokalisation von SUMO in humanen Nierenzellen

Die konjugationsdefiziente SUMO2- Mutante, wurde in Form des Konstrukts VC- S2dGG in HEK293 Zellen transfiziert. Anhand der Abbildung wird deutlich, dass SUMO primär im Zellkern exprimiert wird, aber auch in schwächerer Ausprägung im Cytoplasma vorkommt. Als Kontrolle wurde VC- S2 transfiziert. Dieses ist am gleichen Ort zu finden, wie dessen Mutante.

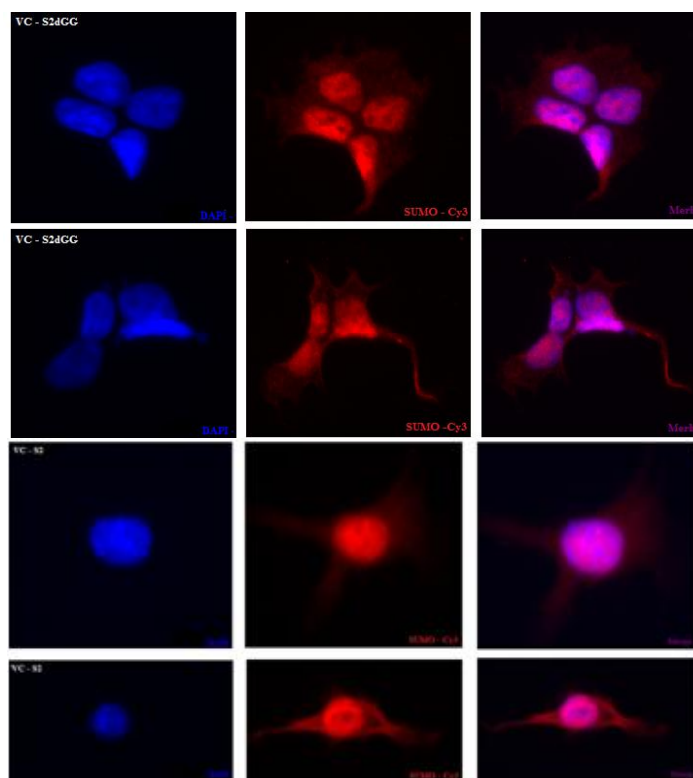


Abbildung 22 Lokalisation von SUMO in HEK293 Zellen

Als Konstrukte wurden VC- S2dGG und VC- S2 transfiziert. Die HEK293 Zellen wurden bei der SUMO- Mutante mit dem Antikörper GFP- C2 behandelt. Bei der Kontrolle VC- S2 wurde der Antikörper Rabbit- Anti- SUMO2 eingesetzt. SUMO ist primär im Zellkern zu finden, wobei auch ein geringer Teil im Cytoplasma nachgewiesen werden konnte.

5.3.3 Lokalisation der Interaktionspartner SUMO und Tau in humanen Nierenzellen

In den Zellen wurde die Lokalisation von sumoyliertem Tau untersucht. Dafür wurde die Kombination VN- Tau und VC-S2dGG transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in unterschiedlichen Bedingungen mit einem Tau- und mit einem SUMO- Antikörper detektiert. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, befindet sich sumoyliertes Tau im gesamten cytoplasmatischen Raum. Eine Verstärkung der Fluoreszenz ist um den Nukleus zu erkennen. Dieses tritt bei SUMO2 und dessen Mutante gleich stark auf.

Anhand der Einzelbilder wird deutlich, dass eine grüne Fluoreszenz an der Stelle auftritt, an der sich ebenfalls Tau befindet.

Anhand der durchschnittlichen Belichtungszeiten zeigte sich, dass für die Kombination mit VC- S2dGG höhere Zeiten notwendig waren, um die gleiche Fluoreszenzintensität zu erhalten, wie bei VC- S2.

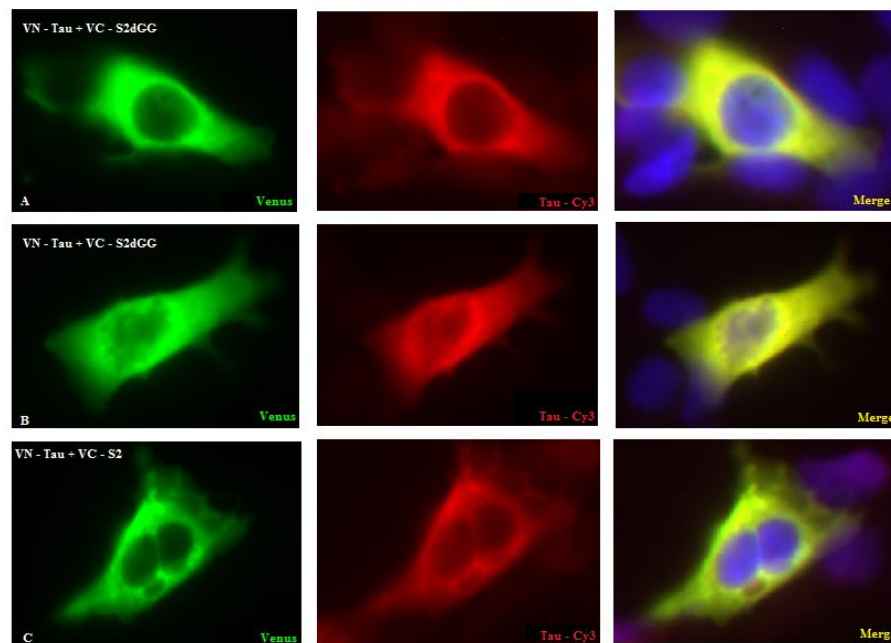


Abbildung 23 Lokalisation von sumoyliertem Tau in HEK293 Zellen

Die Zellen wurden in verschiedenen Bedingungen mit VN- Tau und VC- S2dGG oder VC- S2 transfiziert. Die Detektion von Tau erfolgte mit dem Antikörper HT7. Eine Fluoreszenz zeigt sich im Cytoplasma, wobei eine Präferenz zum Nukleus besteht. Dieses Erscheinungsbild stimmt mit dem Aufenthaltsort von Tau in der Zelle überein.

Es wurde weiterhin die Lokalisation von SUMO in Verbindung mit Tau in HEK- Zellen untersucht. Die transfizierten Zellen wurden mit den Antikörpern GFP- C2 (Abbildung 24, B) und Rabbit- Anti- SUMO2 (Abbildung 24, A, C) behandelt. Die Zellen zeigen alle eine gleichmäßige Fluoreszenz, wobei bei der Kombination mit VC- S2 ein helleres Leuchten um den Zellkern zu beobachten ist. SUMO ist in den Bedingungen im Cytoplasma zu finden.

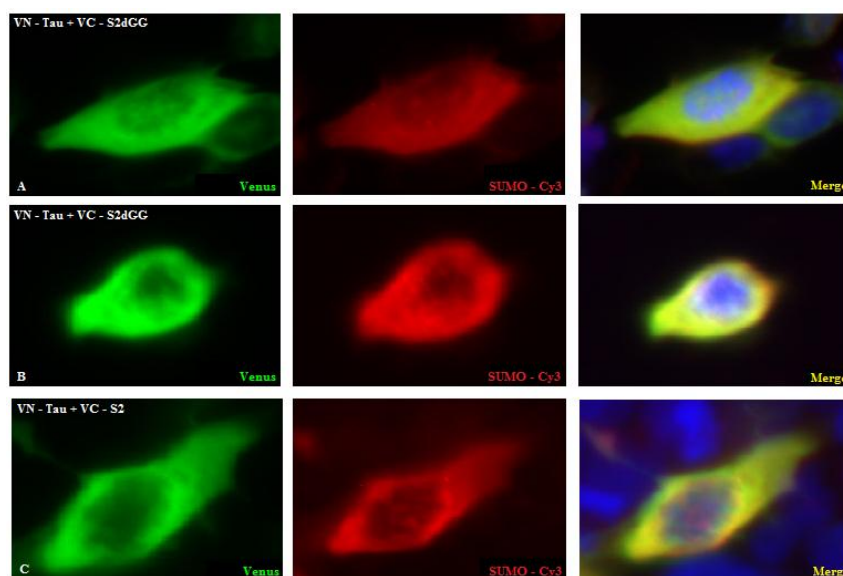


Abbildung 24 Lokalisation von SUMO in den BiFC- Komplexen VN-Tau + VC- S2dGG und VN-Tau + VC- S2

Die Humanen Embryonalen Nierenzellen wurden mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert und nach einer Inkubation von 48 h wurden sie fixiert und immunocytochemisch aufgearbeitet. Die Detektion von SUMO erfolgte mit verschiedenen Antikörpern- A/C: Rabbit- Anti- SUMO2, B: GFP- C2.

Es zeigte sich eine gleichmäßige Fluoreszenz. Bei der Kombination mit VC- S2 tritt häufig eine größere Fluoreszenzintensität im perinukleären Raum auf.

6 Diskussion

Proteininteraktionen sind fundamentale Mechanismen, die den Zellzyklus bestimmen. Der Nachweis und die Charakterisierung dieser ist die Voraussetzung zum Verständnis der Abläufe in Zellen. Es sind viele Methoden bekannt, um diese zu untersuchen. Eine davon ist die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation, die auf der Vervollständigung eines geteilten Fluoreszenzproteins beruht. Es konnten bereits für viele Proteine Interaktionspartner durch diese Methodik nachgewiesen werden [Kerppola, 2008]. In dieser Arbeit wurde das System für die Interaktion des Small- Ubiquitin- Like Modifiers mit Tau angewandt. Bisher wurde in nur einer Studie die Bindung von SUMO an Tau beschrieben [Dorval und Fraser, 2005]. Dabei konnte eine kovalente Anheftung an das Mikrotubuli- Assoziierte Protein gezeigt werden. Es ist jedoch bekannt, dass SUMO über Interaktionsmotive nicht- kovalent an seine Zielproteine binden kann.

6.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation als Nachweismethode der Interaktion von Tau und SUMO

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation stellt neben Systemen wie dem Yeast-Two Hybrid Verfahren oder Immunpräzipitationen eine effektive Methode dar, um Proteininteraktionen zu untersuchen. Bereits für viele Proteine konnte die Methode beim Nachweis von Interaktionspartnern oder bei der Aufklärung der subzellularen Lokalisation eingesetzt werden. Für die Untersuchung wird ein Fluoreszenzprotein benötigt, das an einer Stelle in der Sequenz gespalten wird. Die einzelnen Teile werden anschließend an die zu untersuchenden Proteine kloniert. Kommt es zu einer Interaktion vervollständigt sich das Fluoreszenzprotein und ein Signal ist detektierbar. Diese Methode wurde bereits für Ubiquitin angewandt [Fang & Kerppola, 2004] und als Nachweismethode für Zielproteine des Proteins genutzt. Dabei wurde das transkriptionsregulierende Protein Jun untersucht und Lokalisationsstudien durchgeführt. In derselben Studie wurde sumoyliertes Jun mittels BiFC getestet. Die Isoform 1 des Small- Ubiquitin- Like Modifiers wurde mit Jun exprimiert und die Lokalisation im sumoylierten Zustand detektiert.

Nach dem gleichen Prinzip wurde in der aktuellen Arbeit die Isoform 2 des Small-Ubiquitin- Like Modifiers genutzt, um die Interaktion mit Tau zu untersuchen. Dafür wurde eine Mutante eingesetzt, der das Doppel- Glycin- Motiv entfernt wurde, sodass keine Bindung darüber erfolgen kann. Als Positivkontrolle wurde aber in den Tests eine SUMO2- Kombination verwendet, die dieses Motiv besitzt und eine Konjugation von SUMO an Tau erfolgen kann. Bevor die Methode in Lokalisationsstudien angewendet werden konnte, mussten zuerst einige Tests erfolgen. Bei der Einführung des Systems wurden verschiedene Konstrukte für mögliche Paarungen kloniert. Dabei wurde das geteilte Fluoreszenzprotein Venus genutzt, welches an der Stelle 158 gespalten wurde. Dieser Sequenzabschnitt stellt eine Loop- Region zwischen dem siebten und achten Beta- Faltblatt des Proteins dar. In mehreren Studien wurde dieser Bereich als Schnittstelle vorgeschlagen, da die Komplementation eine große Helligkeit hervorbringt und wenige Hintergrundstörungen entstehen [Kerppola, 2008; Kodama & Hu, 2012]. Da die Konformation der Proteine während einer Interaktion unbekannt ist, wurden die Teile des Fluoreszenzproteins an die verschiedenen Enden von SUMO und Tau kloniert. Somit kann sichergestellt werden, dass die Vervollständigung von Venus nicht beeinflusst wird. Für BiFC- Analysen werden flexible Linker zwischen die zu untersuchenden Proteine und den Teilen der fluoreszierenden Proteine vorgeschlagen, um eine größere Mobilität der formenden Komplexe zu geben [Ohad et al., 2007]. In dieser Arbeit wurden Linker nicht verwendet, da keine idealen Spacer für dieses System bekannt sind. Somit könnten diese die Formation der Proteine beeinflussen, welche zum Verlust der Komplexbildung führt.

Die klonierten Konstrukte wurden in unterschiedlichen Kombinationen in verschiedenen Zelllinien getestet. Dabei zeigte sich überall eine Fluoreszenz, die auf die Komplementation des Venus schließen lässt. Die Beurteilung der Intensität erfolgte mittels der Belichtungszeiten im GFP- Kanal. Meist beträgt die Intensität der gebildeten BiFC- Komplexe nur etwa 10 % der Intensität eines vollständigen Fluoreszenzproteins. Dies ist mit den dynamischen Interaktionen zu begründen. Weiterhin sind nicht alle Proteine an einer Interaktion beteiligt oder eine räumliche Trennung der Partner liegt vor, wodurch ein Verlust der Intensität entsteht [Förg, 2010].

Anhand der Belichtungszeiten erfolgte eine Staffelung der Kombinationsmöglichkeiten. Die Kombination VN- Tau und VC- S2dGG erwies sich dabei als beste Möglichkeit, da diese im Durchschnitt eine kürzere Belichtungszeit benötigte, um gleiche Intensitäten zu erreichen. Das bedeutet, dass bei gleicher Dauer der Belichtung diese Kombination eine größere Helligkeit erzeugt als die anderen Kombinationen. Bei diesen Konstrukten sind jeweils die C- Terminalen Enden der Proteine SUMO und Tau frei zugänglich, was einen Hinweis auf die Konformation bei einer Interaktion gibt. Diese Kombination zeigte auch bei Analyse über das Western- Blot Verfahren das beste Ergebnis.

Zuletzt wurden für das System Kontrollen durchgeführt, um eine alleinige Fluoreszenz der Fragmente auszuschließen. Weiterhin musste eine unspezifische Bindung der Fluoreszenzteile untersucht werden, da es bei gleichem Expressionsort in der Zelle zu zufälligen Kollisionen kommen kann, die zur Vervollständigung des Proteins führen kann, obwohl keine Interaktion vorliegt [Kodama & Hu, 2012]. In Einzeltransfektionen zeigte sich, dass trotz maximaler Belichtungszeit keine Fluoreszenz im GFP- Kanal detektierbar ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine Fluoreszenz nur bei der Komplementation von Venus auftritt. Um eine Vervollständigung des Proteins ohne eine Interaktion auszuschließen, wurde vorgeschlagen, Negativkontrollen zu integrieren, bei denen die Interaktionsflächen der Interaktionspartner mutiert worden. Somit kann keine Fluoreszenz entstehen, die durch die Bindung der zu untersuchenden Moleküle entsteht [Kerppola, 2008]. Bei SUMO und Tau sind die Interaktionsflächen für eine Konjugation bekannt, jedoch nicht für eine nicht- kovalente Interaktion über SUMO- Interaktionsmotive. Somit konnte in dieser Arbeit keine Kontrolle über diese vorgeschlagene Methode durchgeführt werden. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass eine Fluoreszenz durch die Bindung der Proteine entsteht, da der Expressionsort von SUMO und Tau in früheren Studien gezeigt wurde und sich an unterschiedlichen Stellen in der Zelle befindet.

Die Tests wurden in den Zelllinien HEK293 und CSM14.1 durchgeführt. Für beide Systeme wurden die gleichen Ergebnisse erzielt. Somit konnte die Methode der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation für die Charakterisierung der Interaktion von Tau und SUMO vielseitiger eingesetzt werden. Dabei lag die Präferenz aber bei den CSM14.1 Zellen, da der Fokus auf der Untersuchung von Tau in neuronalen Zellen liegt.

Nachdem sich die Kontrollen als negativ erwiesen und die beste Kombinationsmöglichkeit gewählt wurde, fanden Tests zur Lokalisation der Interaktionspartner sowohl einzeln als auch während einer Interaktion statt.

6.2 Nachweis einer Interaktion von Tau und SUMO

Der Prozess der Bindung des Small- Ubiquitin- Like Modifiers an spezifische Zielproteine wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Sumoylierung eine erhebliche Auswirkung auf den Zellzyklus hat. Sie ist z.B. in der Zelldifferenzierung, im Zellwachstum, bei der Transkriptionsfaktoraktivität, bei der subzellularen Lokalisation oder bei Protein-Protein-Interaktionen involviert. Als Substrat wird eine Vielzahl von Proteinen sumoyliert. Darunter befinden sich einige, die Krankheiten wie Krebs, Huntington Syndrom, Parkinson und Alzheimer verursachen. Es ist bekannt, dass das Tau-Protein in neurodegenerativen Krankheiten eine Rolle spielt und ebenfalls durch SUMO modifiziert wird [Wilkinson & Henley, 2010]. Die kovalente Sumoylierung von Tau wurde bereits gezeigt [Dorval & Fraser, 2006]. Mit dem Nachweis von SUMO- Interaktionsmotiven [Minty et al., 2000] wurden weitere Mechanismen der Sumoylierung bekannt. Die Bindung von SUMO und Tau über Interaktionsmotive wurde bisher nicht nachgewiesen. In dieser Arbeit sollten verschiedene Lokalisationsstudien zu den Proteinen erfolgen, um eine Charakterisierung der Interaktion vornehmen zu können.

6.2.1 Lokalisation der Proteine Tau und SUMO

Untersuchungen zu Lokalisationen von Proteinen in Zellen sind die Voraussetzung zum Verständnis ihrer Mechanismen und Interaktionen. In dieser Arbeit wurden die Aufenthaltsorte von SUMO und Tau untersucht. Dafür wurden CSM14.1 und HEK293 Zellen mit verschiedenen Tau- und SUMO- Konstrukten transfiziert, an die jeweils ein Teil des fluoreszierenden Proteins Venus kloniert wurde.

Das Protein Tau gehört zu den Mikrotubuli- Assoziierten Proteinen, das eine wichtige Rolle im Aufbau des Cytoskeletts einnimmt. Es wird hoch exprimiert im zentralen und peripheren Nervensystem. Dort kommt es in Axonen vor, wo es an Mikrotubuli bindet, um diese zu stabilisieren.

Anhand der Lokalisationsstudien in dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass das Protein im cytoplasmatischen Raum zu finden ist. In beiden untersuchten Zelllinien konnte dies beobachtet werden. In einigen Zellen zeigte sich ein verstärktes Auffinden von Tau in der Nähe des Zellkerns, was mehrere Ursachen haben kann. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass das Protein nicht nur mikrotubuli-assoziiert ist, sondern auch an Ribosomen vorkommt. Weiterhin wurde demonstriert, dass Tau ebenfalls im Nukleus zu finden ist [Wang et al., 1993]. Somit könnte das Auffinden von Tau in Kernnähe durch eine nicht- mikrotubuli- assoziierte Funktion zu begründen sein. Eine weitere Möglichkeit ist die Überexpression des Proteins, wodurch es zu Verlagerungen in den Zellen kommen könnte.

Bei der Untersuchung der Lokalisation wurde zum Vergleich GFP- Tau transfiziert. Dabei handelt es sich um ein vollständiges Grün- Fluoreszierendes Protein, das an Tau gebunden ist. Dies wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine Lokalisationsänderungen durch ein geteiltes Fluoreszenzprotein entstehen. Es zeigte sich ein gleicher Expressionsort der Proteine.

Als nächstes wurde die Lokalisation des Small- Ubiquitin- Like Modifiers in Zellen untersucht. Dabei wurden wieder die bereits erwähnten Zelllinien verwendet. Es wurde der Expressionsort von SUMO 2 und dessen Mutante untersucht, welche mit dem C-Terminalen Teil des gesplitteten Venus verbunden waren. Es ist bekannt, dass die Isoformen von SUMO im Nukleus vorkommen. Dies konnte hier bestätigt werden. In den getesteten CSM- und HEK Zellen konnte das Protein im Zellkern nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich einige Unstimmigkeiten bei der mikroskopischen Auswertung. Bei einigen Zellen konnte ein starkes SUMO- Signal im Cytoplasma detektiert werden. Dies war v.a. bei Zellen zu beobachten, die gerade in bestimmte Zellmechanismen involviert waren. Dazu zählt z.B. Zellteilung oder Zell- Zellkontakt. Dies ist anhand der Mikroskopiebilder aber nicht belegbar. Für die Analyse wurden zwei verschiedene Antikörper genutzt. Der Rabbit- Anti- SUMO2 erkannte das Protein vorwiegend im Nukleus, außer die Zellen waren in Aktion, wodurch beschriebene Auffälligkeiten detektiert worden. Weiterhin wurde ein GFP- Antikörper genutzt, der das C- Terminale Ende des Grün- Fluoreszierenden Proteins und dessen Varianten erkennt. Dieser detektierte SUMO vorwiegend im Cytoplasma, wobei eine Präferenz zum Zellkern hin zu sehen war.

Eine Erklärung dafür ist eine unspezifische Bindung des Antikörpers. Weiterhin könnte er für diese Untersuchungen nicht funktionieren. Der Antikörper wurde u.a. auch in Western Blot Analysen eingesetzt, wo ebenfalls kein Signal detektiert werden konnte. Um ein Funktionieren des Antikörpers zu garantieren, hätte dieser zuerst in einem Kontrollversuch getestet werden müssen. Im Vergleich zu dem Rabbit- Antikörper wurden viel längere Belichtungszeiten benötigt, um ein Bild zu erhalten. Dies könnte andererseits bedeuten, dass aufgrund der kürzeren Belichtungszeit das Auffinden von SUMO im Cytoplasma durch den Rabbit- Antikörper nicht detektiert wurde.

Alle genannten Auffälligkeiten traten bei beiden Zelllinien sowohl bei SUMO2 als auch bei dessen Mutante SUMO2dGG auf. Anhand der Lokalisationsstudien wird deutlich, dass der Expressionsort von SUMO und Tau in der Zelle an unterschiedlichen Orten stattfindet und für eine Interaktion ein Protein an eine andere Stelle transportiert werden muss.

6.2.2 Lokalisation der Proteine während einer Interaktion

Protein- Protein- Interaktionen finden ständig und überall in der Zelle statt. Durch sie sind die komplexen Mechanismen wie z.B. die der Replikation, Transkription und Translation möglich. Für viele Prozesse sind Proteininteraktionen bekannt, doch ein Großteil blieb bisher ungeklärt. Dabei inbegriffen ist die Sumoylierung, für die zwar viele Zielproteine für eine Interaktion nachgewiesen worden, aber die molekularen Auswirkungen meist unbekannt sind. Dazu zählt auch die Bindung von SUMO an Tau. Es konnte gezeigt werden, dass eine Konjugation erfolgt, aber die Konsequenzen dieser Interaktion sind nicht bekannt. Um den Mechanismus besser zu verstehen wurde in dieser Arbeit die Lokalisation der Proteine während einer Bindung untersucht. Dafür wurden die Zelllinien HEK293 und CSM14.1 genutzt. Mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation konnte eine Detektion erfolgen.

Im GFP- Kanal wurde im gesamten cytoplasmatischen Raum eine grüne Fluoreszenz beobachtet, die auf eine Interaktion von SUMO und Tau schließen lässt, da das geteilte Fluoreszenzprotein Venus vervollständigt wurde. Dies war bei beiden Zelllinien sowohl bei der Isoform 2 von SUMO als auch bei dessen Mutante zu sehen.

Somit ist bestätigt, dass der Small- Ubiquitin- Like Modifier über eine kovalente Bindung mit Tau interagiert und über ein SUMO- Interaktionsmotiv, wodurch eine nicht- kovalente Interaktion erfolgt.

Anhand der Belichtungszeiten zeigte sich, dass die Bindung von SUMO 2 an Tau über eine Isopeptidbindung eine stärkere Fluoreszenz hervorruft, da im Vergleich zu SUMO2dGG kürzere Zeiten notwendig waren. Daraus wird deutlich, dass eine kovalente Interaktion eine stärkere Bindung erzeugt und womöglich häufiger in den Zellen vorkommt, wodurch eine größere Fluoreszenzintensität entsteht. Der zeitliche Unterschied zwischen SUMO2 und dessen Mutante war bei den CSM14.1 Zellen größer als bei den HEK293 Zellen. Letztere benötigten generell viel weniger Belichtungszeit um eine starke Fluoreszenz zu detektieren. Weiterhin war nach der Transfektion schon nach wenigen Stunden das Fluorophor ausgebildet und ein Signal detektierbar, wohingegen bei den CSM Zellen nach gleicher Inkubationszeit noch keine Fluoreszenz zu sehen war. Die Humanen Embryonalen Nierenzellen entsprechen weniger dem natürlichen Vorkommen von Tau, wodurch ein Vergleich zu den CSM Zellen kritisch betrachtet werden muss.

Anhand der mikroskopischen Auswertung wird deutlich, dass eine Sumoylierung von Tau im Cytoplasma stattfindet. Dabei fällt auf, dass bei SUMO2 eine hellere Fluoreszenz um den Zellkern entsteht als bei SUMO2dGG. Bereits bei der Lokalisation von Tau alleine zeigte sich eine Präferenz zum Zellkern hin. Dies konnte bei beiden Zelllinien beobachtet werden. Jedoch trat die verstärkte Fluoreszenz um den Zellkern bei den HEK293 Zellen öfter auf und der Unterschied zwischen SUMO2 und dessen Mutante war geringer. Dies könnte mit der geringeren Größe der Zellen erklärt werden, wodurch weniger Platz vorhanden ist und eine Verstärkung um den Nukleus automatisch auftritt.

Beim Vergleich der Zellen im GFP- und Cy3- Kanal wird bestätigt, dass eine Fluoreszenz an den Stellen zu finden ist, an denen sich SUMO und Tau gleichzeitig befinden. Somit kann noch einmal verdeutlicht werden, dass die Fluoreszenz durch die Komplementation von Venus entsteht, die eine Interaktion der Proteine voraussetzt.

Bei der Untersuchung der subzellularen Lokalisation von Tau und SUMO alleine konnte eine räumliche Trennung gezeigt werden. Da aber eine Interaktion nachgewiesen werden konnte, zeigt sich, dass ein Transport der Proteine stattfinden muss.

An den Ergebnissen ist zu sehen, dass SUMO weniger oder gar nicht im Zellkern zu finden ist, wenn es eine Bindung mit Tau eingeht. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass durch bestimmte Mechanismen das Protein aus dem Nukleus transportiert wird und zum Tau gelangt. Das Mikrotubuli- Assoziierte Protein ändert dabei seine Lokalisation nicht. Bereits in anderen Studien konnten Lokalisationsänderungen bei der Sumoylierung gezeigt werden. Jedoch zeigte sich hier eine Verlagerung der Zielproteine in den Nukleus. Bei der Arbeit von Sung und Huh z.B. konnte das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) im sumoylierten Zustand im Zellkern nachgewiesen werden, obwohl die genutzte Form Kupfer-Zink SOD in Eukaryoten im Cytoplasma zu finden ist [Sung & Huh, 2010]. Somit wird deutlich, dass die Verschiebung der Lokalisation beim Prozess der Sumoylierung in beide Richtungen verlaufen kann und die molekularen Auswirkungen der Bindung die Änderungen bestimmen. Da Tau im Cytoplasma zur Stabilisierung benötigt wird, ist eine Verlagerung in den Nukleus fragwürdig.

Bei der Auswertung der CSM Zellen zeigten sich Auffälligkeiten bei der Verteilung der Fluoreszenz. In einigen Zellen konnte ein erhöhtes Auffinden von Tau und SUMO in den Ausläufen der Zellen beobachtet werden, die sich durch eine größere Fluoreszenzintensität darstellten. Diese Ausstülpungen werden als Filopodien und Lamellipodien bezeichnet, die bei der Zellmigration eine Rolle spielen. Lamellipodien dienen Zellen zur Umgebungserkundung bei der Bewegung und zur Ausbreitung kurz nach dem Aussäen. Mit den fingerartigen Enden, den Filopodien, nehmen Zellen Kontakt zu anderen auf [Schäfer, 2010]. Die beschriebenen Strukturen werden u.a. durch Aktin gebildet, welches zur Stabilisierung des Cytoskeletts dient. Es ist bekannt, dass Tau in einem nicht- mikrotubuli- assoziierten Prozess mit Aktin interagiert [Correas et al., 1990]. In der Studie von Yu und Rasenick konnte eine Colokalisation von Tau und Aktin in den lamellipodienartigen Ausläufen beobachtet werden. Dies trat auf, wenn die verwendeten Zellen mit einem Nervenwachstumsfaktor (NGF) behandelt wurden [Yu & Rasenick, 2006]. Die in dieser Arbeit beobachteten Einlagerungen in den Zellenden lassen somit darauf schließen, dass es sich um wachsende Zellen handelt.

Da auch ein erhöhtes Auffinden von SUMO in diesen Bereichen zu sehen war, könnte die Annahme bestehen, dass die Bindung von SUMO das Zellwachstum unterstützt. Ein anderer Grund für die Lokalisation von Tau in diesen Bereichen könnte eine Überexpression des Proteins sein.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die erhöhte Expression von APP- Proteinen zur Bildung von Filopodien führt [Langer, 2006]. Die APP- Proteine sind wie Tau am Krankheitsbild von Alzheimer beteiligt und könnten daher die gleichen Mechanismen in der Zelle auslösen. In einer anderen Arbeit konnte ebenfalls die Formänderung von Zellen bei einer Überexpression von Tau beobachtet werden [Yoshizaki et al., 2004]. Die Sumoylierung könnte in diesem Zusammenhang als Schutzmechanismus der Zelle angesehen werden, da das verstärkte Auftreten von freiem Tau zu Schäden führen kann. Die beschriebenen Beobachtungen sind vorwiegend bei der SUMO2- Mutante aufgetreten, bei der eine Interaktion nicht- kovalent erfolgt. Wie bereits beschrieben konnte eine SUMO2- Konjugation verstärkt um den Zellkern detektiert werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass sumoyliertes Tau in diesem Bereich in stabilerer Form benötigt wird, da die gebildete Peptidbindung eine stärkere Anheftung erzielt, die durch Enzyme getrennt werden muss. Die Sumoylierung über Interaktionsmotive dagegen beruht auf einer Ionenbindung, die schnell gelöst werden kann. Somit könnte das sumoylierte Tau in den Ausläufen der Zellen nur kurzzeitig benötigt werden, was durch eine nicht- kovalente Interaktion erfolgt und das verstärkte Auftreten der SUMO2dGG- Bindung erklärt.

7 Ausblick

Mit der Einführung der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation für die Proteine SUMO und Tau eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Untersuchung der Interaktion.

In dieser Arbeit wurde eine Bindung von SUMO an Tau über ein Interaktionsmotiv nachgewiesen. Es bleibt zu klären an welcher Stelle in der Sequenz sich dieses Motiv befindet bzw. ob es von den vorgeschlagenen Mustern mehrere Interaktionsflächen gibt. Weiterhin können Studien zur Beeinflussung von Stressoren durchgeführt werden. In der Studie von Dorval und Fraser wurden erste Tests zur Beeinflussung von Proteaseinhibitoren und Hyperphosphorylierung angewandt. Dies könnte ebenfalls für die nicht-kovalente Interaktion untersucht werden.

Die BiFC konnte bereits in zwei Zelllinien getestet werden, was zu der Annahme führt, dass sich noch weitere Zellen für die Untersuchungen eignen. In der Studie von Sung und Huh z.B. wurde *Saccharomyces cerevisiae* für den Nachweis einer Sumoylierung verwendet [Sung & Huh, 2010]. Die Methode kann noch weiterentwickelt werden, indem andere Proteine getestet oder neue Fluoreszenzproteine genutzt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Multicolor BiFC, bei der mehrere Proteininteraktionen gleichzeitig detektiert werden können. Damit könnte u.a. die Dynamik von SUMO und Ubiquitin mit Zielproteinen untersucht werden. Für diese Methode müssen verschiedene Fragmente von unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen genutzt werden, die bei der Komplementation in unterschiedlichen Wellenlängen detektiert werden können. Mit dieser Methode könnte auch die Sumoylierung von Tau durch SUMO2 und dessen Mutante in einer Zelle analysiert werden.

Zuletzt bleibt die auffällige Verteilung von sumoyliertem Tau in den Ausläufen der Zellen zu klären.

8 Zusammenfassung

Die Charakteristik verschiedener Proteine wird durch ihre Interaktion mit anderen Molekülen beschrieben. Die eingegangenen Bindungen reichen von den starken kovalenten Kräften, über Ionenbindungen bis hin zu den schwachen Van- der- Waals-Kräften.

Der Small- Ubiquitin- Like Modifier ist bekannt für seine vielen Interaktionen mit anderen Proteinen. Das 12 kDa schwere Protein kann über kovalente Anheftung an spezifische Moleküle binden und diese in ihrer Aktivität beeinflussen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Interaktion über schwächere ionische Bindungen. Es wurde bereits eine Vielzahl von Zielproteinen von SUMO identifiziert. Dazu zählt das Mikrotubuli- Assoziierte Protein Tau, das für die Stabilisierung des Cytoskeletts verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von SUMO und Tau untersucht. Es wurde zuerst die Methode der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation für dieses System etabliert. Dafür wurde zwei Teile des fluoreszierenden Proteins Venus jeweils an die Proteine kloniert. Es wurde primär die nicht- kovalente Interaktion untersucht, weshalb eine Mutante von SUMO2 verwendet wurde. Dieser wurde das Doppel- Glycinmotiv entfernt, wodurch nur eine Bindung über SUMO- Interaktionsmotive erfolgen kann. Bei allen Experimenten wurde SUMO2 als Positivkontrolle mitgeführt. Nachdem sich die hergestellten Konstrukte als geeignet erwiesen, konnten Nachweise zur Lokalisation von SUMO und Tau erfolgen. Die BiFC wurde in zwei verschiedenen Zelllinien getestet, um eine vielfältige Anwendungsmöglichkeit zu gewährleisten.

In den Ergebnissen zeigte sich eine räumliche Trennung der Proteine, wenn keine Interaktion vorliegt. Tau wird dabei im Cytoplasma exprimiert und SUMO ist im Nukleus zu finden. Sumoyliertes Tau konnte im cytoplasmatischen Raum nachgewiesen werden, was bedeutet, dass SUMO für eine Interaktion den Zellkern verlässt und zu seinem Zielprotein transportiert wird.

Bei SUMO2, die eine Isopeptidbindung über das GG- Motiv ausbildet, konnte eine verstärkte Sumoylierung im perinukleären Raum detektiert werden. Eine Bindung der SUMO2- Mutante mit Tau wurde vorwiegend im gesamten Cytoplasma beobachtet.

Jedoch zeigten einige CSM- Zellen Auffälligkeiten bei der Verteilung des sumoylierten Proteins.

Es konnte ein verstärktes Auffinden von sumoyliertem Tau in den Ausstülpungen der Zellen beobachtet werden. Diese Bereiche werden als Filopodien und Lamellipodien bezeichnet und dienen der Zellmigration. Diese Beobachtungen wurden verstärkt bei der SUMO- Mutante detektiert.

In dieser Arbeit konnte eine nicht- kovalente Interaktion von SUMO und Tau mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation gezeigt werden. Weiterhin wurde deutlich, dass ein intrazellulärer Transport von SUMO zu seinem Zielprotein stattfinden muss, um eine Interaktion auszuüben.

Es konnte die Methode der BiFC für dieses System etabliert und in verschiedenen Zelllinien eingesetzt werden.

9 Summary

The characteristic of proteins is described by interactions with other molecules. The emerging bonds range from strong covalent bindings to ionic bonds to weak van der Waals' forces. The small ubiquitin like modifier (SUMO) is known for its interactions with other proteins. The 12 kDa- protein can covalently bind to specific molecules and influence their activity. In addition there it can interact though weaker ionic bonds. Many target proteins of SUMO have been identified so far. The microtubule-associated protein tau is known to be one of them. In this work the interaction between SUMO and tau was characterized. At first a method called bimolecular fluorescence complementation was established in cells. Two fragments of the split fluorescent protein Venus were fused to the proteins Tau and SUMO, either N- terminally or C- terminally. Primarily the non- covalent interaction was investigated using a mutant form of SUMO2 that lacks the C- terminal di-glycine motif. This mutant SUMO is deficient in covalent binding to other proteins. In all experiments SUMO2 wild type with the di-glycine motif was used as a positive control. After establishing the BiFC system in two different cell lines, localization studies for SUMO and tau were performed.

The results indicated that SUMO and tau are localized in different subcellular compartments in case that they do not interact. The microtubule- associated protein was found in the cytoplasm whereas SUMO was located within the nucleus. Sumoylated tau was shown to be in the cytoplasmic area suggesting that SUMO leaves the nucleus to interact with tau. SUMO2 is able to build an isopeptide bond with its target proteins. This sumoylation was found to be increased in the perinuclear region indicated by a higher fluorescence intensity in this part of the cell. The binding of the conjugation-deficient SUMO2 mutant to tau was primarily detected through the whole cytoplasm. But there were some exceptions to the distribution of sumoylated tau in CSM cells. An increased amount of tau interacting with SUMO was found at the tips of the cells called filopodia and lamellipodia. These temporary projections are involved in cell migration. These findings were common in the SUMO2 mutant.

In this work a non- covalent interaction between SUMO and tau was investigated using bimolecular fluorescence complementation. Additionally the results indicated an intracellular transport of SUMO to its target protein in the cytoplasm. It was possible to establish the BiFC for the SUMO/tau system and introduce it to different cell lines.

Anhang

Belichtungszeiten der verwendeten Bilder

CSM14.1 Zellen	Belichtungszeit GFP- Kanal (ms)
Test BiFC:	
Tau- VN + VC- S2	33002
Tau- VN + VC- S2dGG	31573
Tau - VN + S2dGG - VC	40000
VN- Tau + VC- S2	13502
VN- Tau + VC- S2dGG	30604
VN - Tau + S2dGG- VC	40000
Kontrollen:	
Tau - VN	40000
VN- Tau	40000
VC- S2	40000
VC- S2dGG	40000
S2dGG - VC	40000
Lokalisation Tau während Interaktion:	
VN- Tau + VC- S2dGG (oben)	40000
VN- Tau + VC- S2dGG (unten)	20761
VN- Tau + VC- S2 (oben)	40000
VN- Tau + VC- S2 (unten)	36699
Lokalisation SUMO während Interaktion:	
VN- Tau + VC- S2dGG (A)	34685
VN- Tau + VC- S2dGG (B)	40000
VN- Tau + VC- S2 (A)	40000
VN- Tau + VC- S2 (B)	40000
Auffällige Zellen:	
VN- Tau + VC- S2dGG (A)	18465
VN- Tau + VC- S2dGG (B)	40000

HEK293 Zellen	Belichtungszeit GFP- Kanal (ms)
Lokalisation Tau während Interaktion:	
VN- Tau + VC- S2dGG (A)	1895
VN- Tau + VC- S2dGG (B)	1242
VN- Tau + VC- S2 (C)	3365
Lokalisation SUMO während Interaktion:	
VN- Tau + VC- S2dGG (A)	842
VN- Tau + VC- S2dGG (B)	2375

Durchschnittliche Belichtungszeiten zum Test der besten Kombinationsmöglichkeit

Kombination	Belichtungszeit GFP- Kanal (ms)
VN- Tau + VC- S2dGG	16363
VN- Tau + VC- S2	20792
Tau- VN + VC- S2	21591
Tau- VN + VC- S2dGG	27761
Tau - VN + S2dGG - VC	35349
VN - Tau + S2dGG- VC	40000

Literaturverzeichnis

- Correas, I., Padilla, R., Avila, J. (1990): *The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding.* Biochem. J. 269, S. 61-64
- Dohmen, Jürgen R. (2004): *SUMO protein modification.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1695 (1-3), S. 113–131
- Dorval, Veronique; Fraser Paul E. (2006): *Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Modification of Natively Unfolded Proteins Tau and α -Synuclein.* Journal of Biological Chemistry 281 (15), S. 9919–9924
- Fang, D., Kerppola, T. (2004): *Ubiquitin-mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch_AIP4 is localized to lysosomes.* PNAS 101 (41), S. 14782–14787. DOI:10.1073_pnas.0404445101
- Förg, T; Ponce, L.; Tomsche, A; Holloschi, A; Lux, A; Hafner, M. (2010): *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): Investigation of composition and cellular localization of homo- and heterodimeric transmembrane receptors and intracellular signalling pathway.* Microscopy: Science, Technology, Applications and Education
- Gill, G. (2004): *SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?* Genes & Development 18 (17), S. 2046–2059
- Hsu, Shang-Te Danny; Behrens, Caroline; Cabrita, Lisa D.; Dobson, Christopher M. (2009): *¹H, ¹⁵N and ¹³C assignments of yellow fluorescent protein (YFP) Venus.* Biomol NMR Assign 3 (1), S. 67–72
- Isogai, Masami; Kawamoto, Yoshihiro; Inahata, Kazuto; Fukada, Harumi; Sugimoto, Kenji; Tada, Toshiji (2011): *Structure and characteristics of reassembled fluorescent protein, a new insight into the reassembly mechanisms.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 21 (10), S. 3021–3024
- Kar, Santwana et al. (2002): *Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol.* The EMBO Journal. Vol. 22 (1) S. 70-77
- Karlson, Peter; Doenecke, Detlef, Koolman; Jan , Fuchs, Georg; Gerok, Wolfgang (2005): *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie.* 15. Auflage: Thieme

- Kerppola, Tom K. (2008): *Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells*. Annu. Rev. Biophys. 37 (1), S. 465–487
- Kerscher, Oliver (2007): *SUMO junction—what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs*. EMBO Rep 8 (6), S. 550–555
- Kodama, Yutaka; Hu, Chang-Deng (2012): *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives*. Biotech 53 (5)
- Kolarova, Michala et al (2012): *Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease*. International Journal of Alzheimer's Disease 2012 (1), S. 1–13
- Langer, Andreas (2006): *Untersuchungen zur Induktion von Filopodien durch das Amyloid Precursor Like Protein 1 (APLP1), ein Mitglied der APP-Genfamilie*. 104 Seiten, Mainz, Johannes Gutenberg-Universität, Fachbereich 10 Biologie, Dissertation
- Martin, Stéphane; et al. (2007): *Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction*. Nat Rev Neurosci 8 (12), S. 948–959
- Merrill, Jacqueline et al. (2010): *A Role for Non-Covalent SUMO Interaction Motifs in Pc2/CBX4 E3 Activity*. PLoS ONE 5 (1), S. e8794
- Minty, A. et al (2000): *Covalent Modification of p73 α by SUMO-1*. Journal of Biological Chemistry 275 (46), S. 36316–36323.
- Morris, Meaghan et al. (2011): *The Many Faces of Tau*. Neuron 70 (3), S. 410–426
- Nagai, T; Keiji Ibata, K.; Eun Sun Park, E; Kubota, M.; Mikoshiba, K; Miyawaki, A (2002): *A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological application*. Nature (20)
- Ohadi, N.; Shichrur, K.; Yalovsky, S. (2007): *The Analysis of Protein-Protein Interactions in Plants by Bimolecular Fluorescence Complementation*. Plant Physiology, 145, S. 1090–1099, DOI: 10.1104/pp.107.107284
- Phizicky, Eric, Fields, Stanley (1995): *Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis*. American Society for Microbiology (1), S.94-123
- Rekas, A. (2002): *Crystal Structure of Venus, a Yellow Fluorescent Protein with Improved Maturation and Reduced Environmental Sensitivity*. Journal of Biological Chemistry 277 (52), S. 50573–50578
- Sarge, Kevin D.; Park-Sarge, Ok-Kyong (2009): *Sumoylation and human disease pathogenesis*. Trends in Biochemical Sciences 34 (4), S. 200–205

- Schäfer, Claudia (2010): *Analyse der Zellwanderung am Beispiel von Keratinozyten: Zusammenspiel von Filopodien, Kraftherzeugung und Matrix-Sekretion*. 54 Seiten Bonn, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen, Dissertation
- Schneider, Anja; Mandelkow, Eckhard (2008): *Tau-Based Treatment Strategies in Neurodegenerative Diseases*. Neurotherapeutics. Vol. 5, S. 443–457
- Shyu, Y., Hiatt, J. Susan, M., Duren, H.; Ronald E., Kerppola, Tom. Hu, C. (2008): *Visualization of protein interactions in living Caenorhabditis elegans using bimolecular fluorescence complementation analysis*. Nat Protoc 3 (4), S. 588–596
- Sung, M., Huh, W. (2010): *In vivo quantification of protein–protein interactions in Saccharomyces cerevisiae using bimolecular fluorescence complementation assay*. Journal of Microbiological Methods 83 (2010), S. 194–201, DOI: 10.1016/j.mimet.2010.08.021
- URL1 (15/07/2013): Unbekannt, *Overview of Protein-Protein Interaction Analysis* URL: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=80891B89-0B0F-4CDC-B85C-7871BFDF7AD1>
- URL2 (05/08/2013) Unbekannt, *SUMO*. URL: <http://www.bostonbiochem.com/products/sumo>
- URL3 (27/06/2013): Unbekannt, *Green Fluorescent Protein (GFP)* URL: http://www.rcsb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/download/GFP.pdf
- Van G., Wilson (2009): *SUMO Regulation of Cellular Processes*. 1. Auflage: Springer
- Wilkinson, Kevin A.; Henley, Jeremy M. (2010): *Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation*. Biochem. J. 428 (2), S. 133–145
- Yoshizaki, C., Tsukane, M., Yamauchi, T. (2004): *Overexpression of tau leads to the stimulation of neurite outgrowth, the activation of caspase 3 activity, and accumulation and phosphorylation of tau in neuroblastoma cells on cAMP treatment*. Neuroscience Research, 49,(4), S. 363-371 DOI: 10.1016/j.neures.2004.04.005
- Yu, J. –Z; Rasenick, M. (2006): *Tau associates with actin in differentiating PC12 cells*. The FASEB Journal 20 (9), S. 1452–1461. DOI: 10.1096/fj.05-5206com

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 23. August 2013

Maria Fankhänel